

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHICO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

Reprinted by
TOA BOOK EXPORTS, INC.

Tokyo Kosho Kaikan Building
Kanda Ogawa-cho 3-22, Tokyo
CABLE: Toaperiodical, Tokyo
PHONE: Tokyo 291-1448

A NEW MICRO-GLASS ELECTRODE AND THE pH OF ARTERIAL, VENOUS AND CAPILLARY BLOOD.

(Studies on the blood pH estimated by the glass electrode method. V)

By

HISATO YOSHIMURA.

(From the 1st Division of the Institute of Physiology, Kyoto Imperial
University. Director: Prof. Dr. R. Shoji.)

(Received for publication, January 9, 1936)

INTRODUCTION.

In our first report we described a new glass electrode made of commercial soft glass, which is suitable for determining the pH of biological fluids, especially that of the blood. With this electrode, however, we need a blood quantity of 1 cc. or more, so that it is not suitable for a small animal or human individual from which repeated collections of the sample in sufficient quantity are undesirable. For this purpose, there have been reported several types of micro-glass electrodes. MacInnes and Dole (1929) constructed an electrode of the diaphragm type which needs only 0.14 cc. of the sample, and determined the pH of the vacuolar sap of *Nitella* with it. Similar electrodes for 0.03 or 0.05 cc. were made by Taylor and Birnie (1933), and Fosbinder and Schoonover (1930). Youden and Dobrosky (1931) also designed a capillary electrode which needs 0.01 cc. But these electrodes have some weak points. For example, with the electrode of MacInnes and Dole or with that of Fosbinder and Schoonover, we can not sufficiently avoid the loss of CO₂ from the blood sample. With Taylor and Birnie's electrode, cleaning of the electrode is not easy. As to Youden and Dobrosky's electrode, care was not taken to eliminate the influence of the deviation film and electrical leakage, so that the extent of error of their data was somewhat large, i.e. 0.05 pH. Prevention of electrical leakage is very important, especially in our country where the humidity of the air

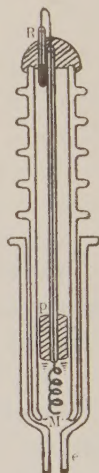
is always dense. In order to avoid these inconveniences, the writer designed a new micro-glass electrode. The arrangement for measuring the potential is the same as described in the first report (1935).

PREPARATION AND USE OF THE ELECTRODE.

The electrode is sketched in Fig. 1. It is constructed with an injection syringe of 1 cc. capacity of which the bottom of the hollow plunger is cut and a thin glass membrane (M) of MacInnes glass is fused on it (cf. MacInnes and Dole, 1930). The thickness of the membrane is 10μ or less, and its electrical resistance is in the order of $10^8\Omega$, when the direct current of ca. 100 volts is passed through it. The plunger of the syringe is made 10 cm. long and bears several ring folds on its shaft which is paraffinized to avoid electrical leakage from the inside of the glass membrane to the outside. In place of these ring folds, a smooth elongation of this part will do well. A plunger with a wall about 1.5 mm. thick is chosen to eliminate the effect of the deviation film.

A tenth normal hydrochloric acid and a silver chloride electrode are mounted in the plunger, and serve as a reference electrode. This electrode is made of a silver plated platinum fused in a capillary tubing. Plating the electrode with a weak current of some 2 milliamperes for 12 hours or so, it is possible to prepare an electrode durable for use for one or two months. The lower end of the capillary tubing bearing the electrode wire is paraffinized (p. in Fig. 1) to prevent the hydrochloric acid solution from flowing out when the syringe is upset. The upper end of the plunger is sealed with wax in which the electrode wire is fixed with its capillary coat. A small mercury reservoir (R) is also sealed in it which serves as a junction of the electrode wire and the leading wire. The wax has a fine hole which allows the air sealed in the plunger to expand without breaking the membrane. After the electrode is constructed, it is kept in distilled water for several days before use to let the membrane attain an equilibrium with water.

Fig. 1.



The solution to be examined, e.g., blood, is drawn into the syringe from its tip (e) directly or through a syringe needle attached. To avoid loss of CO_2 from the blood sample, the space of (e) is previously filled with 2% K-oxalate solution. After drawing the blood in it, the syringe electrode is turned slowly upside-down to let the blood touch the membrane, replacing the oxalate solution without thoroughly intermixing with the blood and then the oxalate solution is rejected. This procedure requires only about 0.07 cc. of blood, its clotting being sufficiently prevented for the measurement.

Previous to mounting the material, the electrode should be kept at the experimental temperature, immersing it in a 1% NaCl solution or distilled water of that temperature. After the measurement, the plunger is drawn off from the syringe, and both of them are washed with streaming water for a while, and then the electrode is reserved in distilled water for the next use.

FUNCTION OF THE ELECTRODE AND SOURCES OF ERROR.

I. Equilibration and reproducibility of the potential.

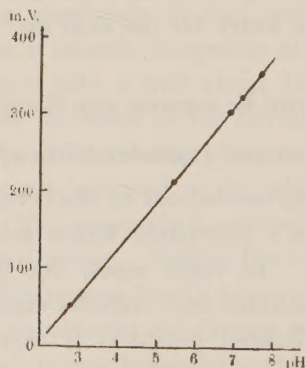
Experiments being carried out on McIlvaine's buffer solution as well as Sørensen's phosphate buffer solution, the following facts were observed. In most cases, the potential attains an equilibrium in 1-3 minutes and remains constant for at least 15 minutes. This equilibrated potential is reproducible within the scope of ca. 1 m.V. in one day. On being examined for many days, however, the potential in a given solution shows a tendency of lowering gradually. This potential means the potential difference between the silver chloride electrode on one side of the glass membrane and the saturated calomel electrode on the other side, and is represented by a positive figure, when the potential of the latter is higher than that of the former, as is the case in ordinary experiments. As the potential of the glass membrane as well as that of the calomel electrode do not change markedly for many days, this gradual lowering of the potential is due to a chemical change of the silver chloride electrode. Thus we must examine the potential

of the glass electrode every day with a certain standard buffer solution of which the pH is determined by means of a hydrogen gas electrode. The speed of this change grows gradually, so that, when the lowering of the potential exceeds 10 m.V. or so, the silver chloride electrode must be renewed.

II. The relation between the pH and the potential of the electrode, and calculation of the pH value from the observed potential.

In Fig. 2, the potential of the glass electrode observed at 37°C in the above mentioned buffer solutions are plotted against the pH values of the same solutions measured by means of the ordinary hydrogen gas electrode at the same temperature. In this figure,

Fig. 2.



we see that the relation is rectilinear, and the slope (α) of the line calculated by means of the method of least squares is 60.1. The value of this slope is a constant (within the scope of 1 unit) characteristic of the electrode examined, it being less in most cases by at most 4 units than the theoretical value (61.5 at 37°C). Thus, if we once determine the value of α for the electrode applied with an accuracy of 1 unit, and test the electrode with a standard buffer solution which has a pH close to that of the solution in question, we can calculate the pH of the solution with an accuracy of 0.01 pH by the formula

$$\text{pH} = \frac{E - E'}{\alpha} + \text{pH}'$$

where E' is the potential of the standard buffer solution of pH' and E is that of the solution in question. If $\text{pH} - \text{pH}'$ is less than 0.5 pH, the calculated pH value is reliable within 0.01 pH, as the value of α has an error of 1 unit, i.e. an error of ca. 2%. If $\text{pH} - \text{pH}'$ is less than 0.2 pH, we can calculate the pH accurately to ca. 0.01 pH, by applying the theoretical value of α , because the true α of the electrode coincides with the theoretical value at least within the scope of error of 7%.

For these calculations, it is advantageous to make use of a nomogram given in Fig. 3. Take the value of $E - E'$ on the m.V. line, and the observed α of the electrode on the α -line, or the experimental temperature ($^{\circ}\text{C}$) on the t -line when the theoretical value of α is adopted, then we can find the pH value required on the intersecting point of the pH-line with the straight line passing through the above mentioned two points. By this method we can find the desired pH with an accuracy of 0.01 pH.

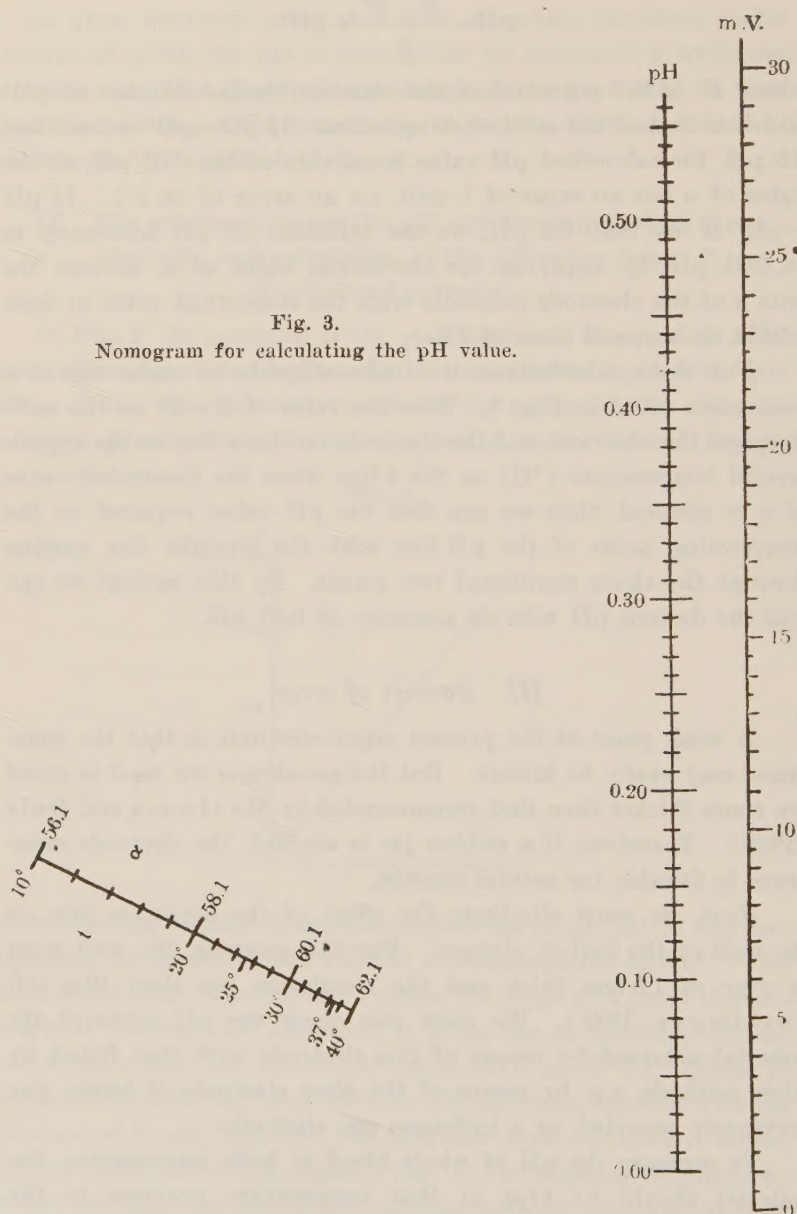
III. Sources of error.

A weak point of the present micro-electrode is that the membrane may easily be broken. But the membrane we used is about ten times thicker than that recommended by MacInnes and Dole (1930). Therefore, if a sudden jar is avoided, the electrode membrane is durable for several months.

Next, we must eliminate the effect of the deviation film on the wall of the hollow plunger. For this purpose, the wall must be over ca. 1.5 mm thick and the membrane less than 10μ (cf. Yoshimura, 1936). We must also check the pH value of the material obtained by means of this electrode with that found by other methods, e.g. by means of the glass electrode of larger size previously reported, or a hydrogen gas electrode.

To measure the pH of whole blood at body temperature, the material should be kept at that temperature previous to the measurement, or the measurement should be done immediately after

Fig. 3.
Nomogram for calculating the pH value.



shedding. Because, according to our experience, the pH of whole blood which is cooled once at the room temperature and then measured at the body temperature, is lower by 0.05 pH or so than that of the same blood measured immediately after collection. The cause of this error is not clear.

APPLICATION TO THE DETERMINATION OF THE BLOOD pH.

I. Comparison between the pH value measured by the micro-electrode and that determined by the glass electrode of larger size or by the hydrogen gas electrode.

In order to determine the scope of experimental error of our micro-electrode method when applied to the blood, the pH of an oxalated horse blood kept in a thermostat of 37°C was measured repeatedly every ten minutes by this method. In most cases, the potential attained an equilibrium within several minutes after the electrode was mounted with the blood. The pH values calculated from these equilibrated potentials coincided within 0.02 pH with one another (cf. Table I). This corresponds to the above mentioned degree of reproducibility of the potential in an ordinary buffer solution. The first report of this series showed that the pH of the whole blood kept at 37°C decreased gradually with the lapse of time owing to glycolysis. We have experienced that the speed of

TABLE I.
Oxalated horse blood at 37°C.

Time (minute)	pH
0	7.307
10	7.314
20	7.315
30	7.304
40	7.320
Mean	7.312
Extent of variation	0.016

glycolysis of an oxalated horse blood which has been left for several hours after collection is slower than that of rabbit blood reported in the first report. This seems to be the main reason why the pH of the whole blood remained unchanged for about one hour in the present experiment.

Now, the pH value of the same oxalated whole blood or the same plasma was determined once with a micro-glass electrode, and again with a glass electrode of larger size or a hydrogen gas electrode. Refer to Table II, Nos. 1-5. The figure in the table is the mean value of several observations of which the number is given in parentheses. Here we see that the values determined by the micro-electrode method coincide well with those obtained by other methods, within 0.01 pH. In rabbit blood at 37°C, of which the speed of glycolysis is rather rapid, the pH of the whole blood was determined by the micro-electrode immediately after shedding, and was compared with the pH of its plasma determined by the hydrogen gas electrode method (as to the method, refer to the second report of this series). In some cases with the whole blood of rabbit at 37°C, the potential of the micro-electrode did not attain an equilibrium for even a few minutes. In such a case, the mean value of the potential between 3 and 5 minutes after shedding was taken to calculate the pH value. The results were the same as those obtained with horse blood (refer to No. 6 of Table II).

TABLE II.

No. of exp.	Animal	Temp.	Plasma		Whole blood	
			Micro-glass electrode (pH)	Hydrogen gas electrode (pH)	Micro-glass electrode (pH)	Larger glass electrode (pH)
1	Horse	37°C	7.390 (6)	7.396 (4)		
2	"	"			7.312 (2)	7.309 (2)
3	"	"			7.365 (3)	7.372 (2)
4	"	"			7.337 (2)	7.337 (2)
5	"	17°C	7.663 (2)		7.664 (2)	7.657 (3)
6	Rabbit	37°C	7.398 (2)	7.410 (3)	7.407 (1)	

The plasma and the whole blood, of which the pH values are given in one line of the table, are of one and the same material. Here we see that the pH of plasma is the same as that of the whole blood, as was already reported in the second report.

II. Comparison of the pH of arterial, capillary and venous blood.

According to current views, the pH of arterial blood is higher by 0.02–0.03 than that of venous blood, the effect of CO₂ loss from the blood in the lung being partially compensated for by the effect of the change of reduced haemoglobin to oxyhaemoglobin (Peters and Van Slyke, 917, 1931). Hasselbalch (1916) was the first who calculated this difference from the gaseous contents of arterial and venous blood. After him, Parsons (1917), Henderson and his collaborators (1924), Peters, Barr and Rule (1920), and also Doisy, Briggs, Eaton and Chambers (1922) ascertained a similar value for this difference. While these investigators calculated the pH from the gaseous contents of arterial and venous blood, Drucker and Cullen (1925) determined the pH of human capillary blood by a colorimetric method, and, assuming it to be the same as the pH of arterial blood, they estimated the pH difference between arterial and venous blood to be 0.03. Bigwood (1923) and Liégeois (1927) also ascertained the difference of 0.02 pH by a colorimetric method applied to dog blood. On the other hand, Lumière, Grange and Malaval (1929) found this difference to be 0.3–0.4 pH by Sørensen's hydrogen gas electrode method. But, judging from the present knowledge, the method of determination adopted by the above investigators was not accurate, and they may include some errors, such as an error due to glycolysis.

Theoretically, it is supposed that both the pH value and the gaseous contents of the capillary blood lie between those of arterial and venous blood. According to previous investigators, however, the gaseous contents of capillary blood are the same as those of arterial blood. For examples, Lundsgaard and Möller (1922) found that the oxygen content of arterial blood was the same as

that of capillary blood and maintained that these two kinds of blood had the same constituents since the oxygen content was the finest indicator of metabolism. Verzàr and Keller (1923) ascertained the same fact. Goldschmidt and Licht (1925) found that the CO_2 - and O_2 -content of arterial blood were the same as those of the blood collected from the vein on the back of the hand, after exposure to hot water. Considering these results, it is supposed that the pH of capillary blood is almost the same as that of arterial blood. But none have yet proved this by direct measurement.

Now, on applying our micro-glass electrode which enables us, excluding the error due to glycolysis, to determine the pH of the capillary blood immediately after shedding, the pH of arterial, capillary and venous blood of a rabbit, as well as of a human adult were compared with one another. The measurements were all made at 37°C .

A) Rabbit blood.

Direct measurement of the pH difference between arterial and venous blood: From a rabbit loosely fixed on a board without anaesthesia, arterial blood (from the carotid or femoral artery) and venous blood (from the jugular vein) were collected successively at the shortest interval possible, i.e. ca. 1.5 minutes. Each sample was mounted in a glass electrode of the larger size. Two glass electrodes thus mounted successively were connected in series, being oppositely directed from each other, and thus the pH difference between the arterial and venous blood was determined directly (cf. the second report). In this procedure, the blood collected first tends to suffer glycolysis earlier than that collected later. To cancel the error due to this, the order of collecting these two sorts of blood was reversed successively, and the pH differences repeatedly measured on the same rabbit were averaged. Results are given in Table III. In measurements after the odd numbers in the table, the arterial blood was first collected, and in those after the even numbers, the venous blood was the first. The pH value of the arterial blood was always higher than that of the venous blood,

TABLE III.
pH difference between the arterial and venous blood of rabbit.

No. of exp.	Normal rabbit		Anaemic rabbit	
	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D
1	0.023 pH	0.020 pH	0.034 pH	0.052 pH
2	0.044	0.041	0.047	0.072
3	0.028	0.021	0.044	0.068
4	0.037	0.039	0.049	0.073
5		0.016		
6		0.024		
Mean	0.033	0.027	0.044	0.066

though the difference was a little smaller in the measurements after the odd numbers than those after the even numbers, owing to the acid change due to glycolysis. On an average, the pH of the arterial blood is larger by 0.03 pH than that of the venous blood in sound rabbits, A and B. Thus the value estimated indirectly by most of the investigators mentioned above was confirmed, the values of Lumière, Grange and Malaval being found to be erroneous. On the other hand, this pH difference between two sorts of blood was found to be a little larger in anaemic rabbits, C. and D. This agrees with the current view that this pH difference grows in anaemic animals, owing mainly to the low buffer action of their blood which has a low haemoglobin content (cf. Peters and Van Slyke, 1916, 1931).

Comparison between the pH of arterial and capillary blood:

A rabbit was lightly narcotized with urethane (1 g/2.5 Kg), and fixed loosely on a board. The cervical sympathetic nerve was cut on one side to set up a hyperaemia in its ear-lob. A large vessel being avoided, an incision was made on the shaven skin of the ear, and the first drop of oozing blood having been wiped off, the wound was dipped in liquid paraffin kept in a small paraffinized dish. Then the second drop was collected in the dish and was sucked up into a micro-glass electrode, and its potential was determined. In

this manner, the capillary blood could be collected without any loss of its gaseous contents. The arterial blood was collected from the femoral artery into a micro-electrode through a syringe needle thrustured into a cannula which was connected with the artery (cf. the first report), and its potential was also measured. Thus the pH of the arterial blood and the capillary blood from one animal were measured repeatedly by turns at intervals of ca. 15 minutes. Results are given in Table IV. Here we see that the pH values of both the capillary blood and the arterial blood remain constant within ca. 0.03 pH at least for about 2 hours, and their mean values coincide with each other within ca. 0.005 pH, though larger differences are seen among single observations. Thus we can take the capillary blood instead of the arterial blood for studying the blood pH.

TABLE IV.

Time (minute)	Rabbit I		Rabbit II	
	Arterial blood	Capillary blood	Arterial blood	Capillary blood
0	—	7.366 pH	—	7.401 pH
15	7.383 pH	—	7.391 pH	—
30	—	7.366	—	7.383
45	7.375	—	7.382	—
60	—	7.389	—	7.369
75	7.354	—	7.357	—
90	—	7.355	—	7.377
105	7.355	—	7.385	—
120	—	7.372	—	—
135	7.354	—	—	—
Mean	7.364	7.370	7.379	7.383

B) Human blood.

To my gratitude, arterial blood was collected from the brachial artery of a human adult with an ordinary injection syringe by Dr. H. Nishio, who is a skilful surgeon in the laboratory of Prof.

Torigata of our university. Venous blood was collected from the cubital vein and capillary blood from the ear incised in the same way as described above in the experiments on rabbit. The pH values of the arterial and venous blood were measured with glass electrodes of larger size, and that of the capillary blood with a micro-glass electrode. Thus, the pH values of different sorts of blood of one human adult were repeatedly determined by turns at intervals of ca. 15 minutes (cf. Table V, a and b). All these values determined were found to lie within the normal pH range of human

TABLE Va.

Time (minutes)	Individual I			Individual II		
	Capillary blood	Arterial blood	Venous blood	Capillary blood	Arterial blood	Venous blood
0	7.349 pH	—	—	7.388 pH	—	—
15	—	7.369	—	—	7.364	—
30	—	—	7.332	—	—	7.317
45	7.362	—	—	7.372	—	—
60	—	7.349	—	—	7.372	—
75	—	—	7.340	—	—	7.309
90	7.349	—	—	7.370	—	—
105	7.353	—	—	—	—	7.357
Mean	7.353	7.359	7.336	7.377	7.368	7.328

TABLE Vb.

Time (minutes)	Individual III		Individual IV		Individual V	
	Arterial blood	Venus blood	Capillary blood	Venous blood	Capillary blood	Venous blood
0	—	7.292 pH	7.362 pH	—	7.356 pH	—
15	7.310	—	—	7.326	—	7.331
30	—	7.284	7.351	—	—	—
45	—	7.278	—	7.309	—	—
60	—	—	7.349	—	—	—
Mean	7.310	7.285	7.354	7.318	7.356	7.331

blood generally accepted, i.e. pH 7.3-7.5 (cf. Peters and Van Slyke, 1939). The pH values of the arterial and capillary blood remained constant within 0.02 pH (the scope of experimental error) at least for 1-2 hours, though a larger variation of the pH value was found sometimes on the venous blood. The mean pH value of the capillary blood and that of the arterial blood of one adult coincided with each other within 0.01 pH. The pH of the arterial blood was always higher by 0.01-0.06 pH than that of the venous blood. Considering that the pH values of the capillary blood of individuals IV and V were equal to those of their arterial blood, the differences between the mean pH of the arterial or capillary blood and that of the venous blood were taken for five human adults observed and are summarized in Table VI. Here we see that the pH of the arterial blood is higher by 0.02-0.04 pH (0.03 on an average) than that of the venous blood. Thus we could directly confirm the result which was previously estimated from the gaseous contents of the blood. The individuals I, II and V were slightly anaemic (80-90% haemoglobin content), because they were blood donors. But no tendency of increasing the pH difference between the arterial and the venous blood was observed.

TABLE VI.

No. of Individual	pH difference between arterial and venous blood
I	0.023 pH
II	0.040
III	0.025
IV	0.036
V	0.025
Mean	0.030

In short, it was confirmed that in rabbits and human adults the pH of arterial blood is higher by 0.03 pH on an average than that of venous blood, while the former coincides with the pH of cutaneous capillary blood within 0.01 pH. The pH of arterial and

capillary blood remains unchanged at least 1-2 hours within 0.02 pH (the scope of experimental error) in resting human adults and within 0.03 pH in rabbits loosely fixed on a board.

RÉSUMÉ.

1. A new micro-glass electrode for 0.07 cc. material was designed. Method of the pH determination with it was described in details.

2. This micro-electrode was applied to the measurement of the blood pH, and it was found that it gave a correct value within 0.02 pH.

3. In experiments on rabbits loosely fixed on a board and on resting human adults, it was confirmed by direct measurement that the pH of arterial blood is more alkaline by 0.03 pH on an average than that of venous blood, while the former coincides with the pH of cutaneous capillary blood within the scope of experimental error.

The expenses of this research were defrayed by a grant from the Hattori-Hoko-Kwai, to whom my thanks are due.

REFERENCES.

- Bigwood (1923): *Compt. rend. soc. biol.*, **88**, 639.
- Doisy, Briggs, Eaton and Chambers (1922): *J. Biol. Chem.*, **54**, 305.
- Drucker and Cullen (1925): *Ditto*, **64**, 221.
- Fosbinder and Schoonover (1930): *Ditto*, **88**, 605.
- Goldschmidt and Licht (1925): *Ditto*, **64**, 53.
- Hasselbalch (1916): *Biochem. Z.*, **78**, 112.
- Henderson, Boek, Field and Stoddard (1924): *J. Biol. Chem.*, **59**, 379.
- Liégeois (1927): *Compt. rend. soc. biol.*, **96**, 425.
- Lumière, Grange et Malaval (1929): *Compt. rend. acad. sci.*, **188**, 364.
- Lungsgaard and Möller (1922): *J. Exp. Med.*, **36**, 559.
- MacInnes and Dole (1929): *J. Gen. Physiol.*, **12**, 805.
- MacInnes and Dole (1930): *J. Amer. Chem. Soc.*, **52**, 29.
- Parsons (1917): *J. Physiol.*, **51**, 440.
- Peters, Barr and Rule (1920): *J. Biol. Chem.*, **45**, 489.
- Peters and Van Slyke (1931): *Quantitative Clinical Chemistry*, **1**, 916, 917, 939, Baltimore.

- Taylor and Birnie (1933): *Science*, **78**, 172.
Verzár und Keller (1923): *Biochem. Z.*, **141**, 21.
Yoshimura (1935): *J. Biochem.*, **21**, 335.
Yoshimura (1935): *Ditto*, **22**, 279.
Yoshimura (1936): *Ditto*, **23**, 91.
Youden and Dobroseky (1931): *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **3**,
347.

ENZYMIC HYDROLYSIS OF NUCLEOTIDES AND NUCLEOSIDES.

I. Hydrolysis of Purine Ribonucleotides.

By

H. ISHIKAWA AND Y. KOMITA.

*(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical College.
Director: Prof. N. Ariyama.)*

(Received for publication, February 4, 1936)

One of the present writers (H. I., 1935) devised a method of determining all the possible intermediary and end-products of hydrolysis of purine ribonucleotides. With the application of this method he followed the processes of acid hydrolysis of nucleotides and brought to light the detailed features of the hydrolysis.

Extending the line of experimentation, it was intended in the present experiments to elucidate the mechanism of the enzymic hydrolysis of purine ribonucleotides. The enzymic hydrolysis of nucleotides begins, according to the prevailing theory, at the liberation of phosphoric acid by the action of nucleotidase with the simultaneous formation of nucleosides, which are decomposed, in turn, to purine bases and ribose by nucleosidase. The nucleosidase is ineffectual in disrupting the glucosidic linkages of nucleotides; it splits off purine bases from nucleosides only. The samples of nucleosidase which were prepared by Levene and Weber (1924 ii) from various animal organs were incapable of separating purine or pyrimidine bases from yeast nucleic acid. Levene and Dmochowski (1931) observed that nucleosidase prepared from pig small intestine was unable to attack the glucosidic linkages of riboguanilylic and adenylic acids. The purified nucleosidase of Klein (1935) which was prepared from various animal organs showed specificity to desoxyribosides; it did not hydrolyze desoxyribo-nucleotides. Thus the possibility of the production of the ester from nucleotides has been denied. However, Schmidt (1931: 1932) found that the watery extract of rabbit liver formed

ribosephosphoric ester from guanylic acid with the simultaneous liberation of purine base and ammonia. The ribosephosphoric ester was isolated as barium salt, but the analytical data on its purity were omitted. He was of the opinion that his results did not conflict with those of Levene and Dmochowski, inasmuch as the disruption of the glucosidic union of the nucleotide might couple with the deamination of guanylic acid, and the disruption might take place only after the conversion of guanylic acid into xanthylic acid.

One of the main objects of the present experiments was to determine whether the glucosidic linkages of nucleotides could be detached by enzyme leaving the ester union unaffected. This was found to be the case. Ribosephosphoric ester was isolated in the pure state from guanylic and xanthylic acids. It is to be noted that the deamination of the guanine-nucleus of guanylic acid was not the preliminary condition for the formation of the ester as Schmidt assumed. The detachment of the glucosidic linkage took place directly in the molecule of guanylic acid. The formation of the ester was demonstrated with the employment of organs and tissues of various animals. The dog pancreas was found to be the best source of the enzyme, as it liberated phosphoric acid from the nucleotides to far a less extent than purine bases.

The possibility of the enzymic disruption of the glucosidic linkages of nucleotides introduces complexity into the mechanism of the decomposition of nucleotides by enzyme. They can be disrupted in every conceivable way just as in the acid hydrolysis. The ester linkage may be first attacked producing phosphoric acid and nucleosides, or the decomposition may begin at the glucosidic linkages yielding purine bases and ribosephosphoric ester. The nucleosides and ester thus formed may be subsequently disrupted into their components.

EXPERIMENTAL.

I. Measuring methods and experimental conditions.

The enzyme solutions were prepared in the following way.

The hashed tissues of various animals were extracted with four times weight of boric acid-borax buffer solution of pH 7.0 for 60 minutes at room temperature, and filtered through gauze. The filtrates were used as the enzyme sources.

The substrates were riboguanlylic and xanthylic acids prepared by the Levene and Dmochowski method (1931).

The procedures of the determination of the hydrolysis-products followed the lines prescribed by Ishikawa (1935). The solutions to be tested were first added with an equal amount of 10% trichloroacetic acid solution to remove the protein contained in the enzyme solutions. Then nucleotides, nucleosides and free purine bases were precipitated with mercuric sulphate solution. This treatment was performed carefully at 0°C avoiding an excess of the mercuric sulphate solution. The adequate quantities of the mercuric sulphate solution were found to lie between 0.5 and 1.0 cc. under the conditions of the present experiments. The nucleotides showed the tendency to dissolve in larger amounts of the mercuric sulphate solution. At room temperature the precipitation of the substances by mercuric sulphate was incomplete. The organic phosphoric acid in the HgSO_4 -filtrate represented ribosephosphoric ester. The free ribose was determined by subtracting the quantity of ribose contained in the ester from the total amount of free and bound ribose in HgSO_4 -filtrate. The total amount of ribose in the HgSO_4 -filtrate was determined by the furfural method or by the reduction method. Nucleosides formed were calculated indirectly in the way mentioned in Ishikawa's paper. The quantities of nucleosides and ester do not mean their total amounts formed, but the amounts existing; they will partly suffer change by being hydrolyzed by nucleosidase and phosphatase, as soon as they are produced.

Ammonia was determined by the vacuum-distillation method. The fluid was alkalinized by the borate-mixture of Parnas and Heller (1924).

In most cases 500.0 mg. of sodium salt of guanylic or xanthylic acid were incubated with 30 cc. of the tissue extracts, and 20 cc. of boric acid-borax buffer of pH 7.5 at 37°C in the presence of 2 cc. of toluene. Aseptic precautions were taken throughout the

experiments; no indications of bacterial growth were obtained. Control experiments were always carried out without the substrate or without the enzyme.

II. *Hydrolysis of nucleotides by pancreas extracts.*

The most interesting results were obtained with the employment of the pancreas extracts of dogs. As shown in Table 1 the content of the nucleotidase in dog pancreas was relatively low; the liberation of inorganic phosphoric acid and the production of nucleosides were not so marked. It is to be noted that relatively large quantities of ribosephosphoric ester were always formed. The production of the ester took place rather slowly; it was still of a slight degree after 5 hours' incubation. It exceeded sometimes 40% of the theoretical value after 24 hours. The quantities of the ester and nucleosides once formed tended to decrease after long incubation. This was due to the subsequent hydrolysis of these substances by nucleotidase and nucleosidase. Guanylic and xanthylic acids behaved in a similar manner. Upon purifying the enzyme by precipitating it fractionally with acetone, the liberation of inorganic phosphate was remarkably reduced. After 24 hours' incubation the extract of acetone-dried powder (1:16) produced, under the experimental conditions, 0.8 mg. of free phosphorus, and 236.2 mg. of the ester which corresponded to 47.2% of the theoretical value. The acetone-dried powder was prepared by the Euler and Brunius method (1927) in the following way. Acetone was gradually added to the fresh extract of pancreas, and the precipitate formed between 40 and 50% concentration of acetone was quickly filtered off, and dried. The yield of the dried powder was 1% of the fresh tissue. The powder was extracted with 8 or 16 times weight of water for 60 minutes at room temperature, and the extract was used as the enzyme source.

The assumption of Schmidt that the ester formation from guanylic acid might take place only after the previous deamination of the guanine-nucleus of the nucleotide, was not realized in the present experiments. It was observed that the production of the ester from guanylic acid did not accompany the liberation of

ammonia at all when the hydrolysis was carried out by the acetone-dried powder of dog pancreas. The extract of the fresh pancreas produced a minute quantity of ammonia, which was too small to give any special significance. In the experiment shown in Table I, 66.49 mg. of the ester were produced after 24 hours, whilst the quantity of ammonia was only 0.5 mg.

TABLE I.

Hydrolysis of Guanylic and Xanthylic Acids by Dog Pancreas.
Experimental conditions have been described in Chapter I.

(Na-salt) Substrate	Time (hours)	Substances produced							
		Inorganic P		Ribosephosphoric ester		Free ribose		Nucleoside	
		mg.	%	mg.	%	mg.	%	mg.	%
Guanylic acid	5	0.79	2.1	23.05	8.2	2.33	0.8	4.12	1.3
	24	1.48	3.9	66.49	21.3	4.06	1.9	6.57	2.1
	48	4.20	11.0	56.73	20.1	16.57	9.0	6.26	2.0
Xanthylic acid	5	0.74	1.8	15.82	5.0	3.51	1.7	0.35	0.1
	24	1.33	3.1	61.44	19.5	6.51	3.2	4.89	1.4
	48	5.48	12.9	46.84	17.2	18.03	8.8	15.91	4.1

The ester was isolated as barium salt in the following way. 10 gm. of sodium guanylate were incubated with 500 cc. of the fresh extract of dog pancreas, 300 cc. of water (pH 7.0) and some toluene for 24 hours at pH 7.5 and at 37°C. Protein of the fluid was removed by colloidal ferric hydroxide. The filtrate was treated with 30 cc. of mercuric sulphate solution to removed guanylic acid, guanosine and guanine. The solution which was then freed from mercury by hydrogen sulphide in the usual way, was neutralized with pure BaCO₃, left in an ice chest overnight, and centrifuged. The supernatant fluid was concentrated under diminished pressure to about 40 cc. The crude ester was precipitated with 3 times volume of absolute alcohol. The yield was about 400 mg. The ester was dissolved in a small quantity of water and precipitated with alcohol. This treatment was repeated 7-8 times. The yield

of the pure ester was about 40 mg. The analytical data of the salt are as follows.

20.0 mg. of Ba ribophosphate yielded 1.65 mg. of phosphorus, and 7.44 mg. of Ba.

$C_6H_6O_6(PO_3Ba)$:

Calculated	P = 8.48%	Ba = 37.59%
Observed	P = 8.23%	Ba = 37.20%

The reducing power determined by the Hanes method corresponded to 7.81 mg. of ribose. This value was 95.25% of the theoretical under the assumption that the reducing power of the ester was 40% of that of ribose. 20 mg. of the salt yielded 4.88 mg. of furfural which corresponded to 93.12% of the calculated value.

Thus it is clear that the enzymic disruption of the glucosidic linkage of the intact guanylic acid can take place without any previous change of the molecule, such as deamination or dephosphorylation. This finding is of interest in view of the opposite opinion of the classical theory. Apprehensions that the bacterial growth, change of hydrogen-ion concentration of the medium during the enzyme action, or some chemical effect during the determination of hydrolysis-products might participate in the production of the ester were strictly excluded.

Xanthylic acid gives clearer results than guanylic acid as the substrate for nucleotidase and nucleosidase. In the presence of guanine-deaminase (in a broad sense), guanylic acid may introduce some perplexities in the results of the hydrolysis, as the enzyme may deaminize not only the free guanine but also guanylic acid or guanosine. However, this confusion can be avoided with the use of xanthylic acid.

Levene and Medigreceanu (1911, i and ii), and Levene and Weber (1924 ii) stated that dog pancreas was an exception among various tissues in entirely lacking nucleosidase. However, so far as examined by the present writers, the aqueous extract of dog pancreas did contain nucleosidase. That the extract hydrolyzed guanosine and xanthosine was indicated by the appearance of free ribose in the $HgSO_4$ -filtrate of the reacting fluid. The quantities of ribose determined by the reduction method and furfural

method showed a fairly good coincidence (Table II). This table also shows that the hydrolysis of guanosine was accompanied by the production of ammonia, the quantity of which corresponded

TABLE II.

Hydrolysis of Nucleosides by Dog Pancreas.

In 30 cc.:

36 mg. of guanosine or xanthosine + 10 cc. of pancreas extract,
2 cc. of toluene. pH 7.5. 37°C. 24 hours.

Enzyme source	Substrate	Ribose liberated				Ammونيا formed (mg.)	
		Reduction method		Furfural method			
		mg.	%	mg.	%	Found	Calculated*
Fresh tissue	Guanosine	17.33	90.7	17.78	93.1	0.20	1.95
	Xanthosine	16.05	84.4	16.61	87.3		
Acetone-powder	Guanosine	5.96	31.2	—	—	0	0.68

* The value of ammonia was reckoned under the assumption that the guanine liberated was completely deaminized.

to 10 percent of the value expected to be formed when the liberated guanine would be completely deaminized. However, the purified enzyme hydrolyzed guanosine without producing ammonia. It seems to the present writers that the reason why Levene and his co-workers failed to find nucleosidase in dog pancreas might be, at least in part, attributed to the circumstance that they used the plasma or the extract which had been previously autolyzed for 18 hours or longer at 40°C. The present writers noticed about a 50 percent reduction of the nucleosidase activity of the fresh pancreas extract after incubation for 24 hours. Levene and Weber (1924 i) themselves also observed the inactivation of the nucleosidase of pancreas after two days' incubation.

Cat pancreas hydrolyzed guanylic acid in a similar way to dog pancreas; the liberation of inorganic phosphate was low while the production of the ester high. The liberation of ammonia was comparatively large. The fresh extract of the organ produced 1.36 mg.

of inorganic phosphorus, 19.66 mg. of the ester and 1.14 mg. of ammonia under the experimental conditions. The presence of nucleosidase in cat pancreas was proved by its ability to hydrolyze guanosine (Table III). It is revealed in the table that ammonia

TABLE III.

Hydrolysis of Guanosine by Cat Pancreas.

In 250 cc.:

250 mg. of guanosine + 30 cc. of pancreas extract, 4 cc. of toluene.

pH 7.5. 37°C. 24 hours.

Ribose was determined by the reduction method.

Ribose liberated (mg.)	Ammonia (mg.)	
	Found	Calculated
20.50	2.10	2.31

was formed at an equimolecular ratio to the guanine liberated. This fact, taken in conjunction with the evidence shown in Table IV that cattle and pig pancreas produced neither the ester nor ammonia from guanylic acid, appears to support Schmidt's hypothesis that deamination of guanine-nucleus proceeds the detachment of the glucosidic linkage. However, considering what was observed in dog pancreas, it is clear that the deamination cannot always be construed as preparatory to the disruption of the glucosidic linkage of guanylic acid. The fact given in Table IV that pancreas of pig and cattle produced a large amount of guanosine without liberating ammonia, confirms the observation of Jones (1911) that pig pancreas was not furnished by guanosine-deaminase. Since pig pancreas contained guanase, ammonia should have been produced, if guanine had been liberated from guanylic acid. There is another possibility for the production of ammonia that it may be the sequence of the action of guanase on guanine liberated from nucleotide or nucleoside. The guanine-deaminase of dog pancreas was destroyed by the purification method of nucleosidase, while the enzyme which detached the glucosidic linkages of guanylic acid and guanosine survived the treatment.

The enzyme which formed the ester from nucleotides, and

TABLE IV.

Hydrolysis of Nucleotides by Pig and Cattle Pancreas.

Experimental conditions have been described in Chapter I.

Animal	Substrate (Na-salt)	Time (hours)	Inorg. P (mg.)	Ester (mg.)	Free ribose (mg.)	Nucleoside (mg.)	Ammonia (mg.)
Pig	Guanylic acid	5	+	0	0	+	0
		24	3.82	0	0	34.86	0
		48	5.15	0	0	47.00	0
	Xanthylic acid	5	0.48	0	0	4.38	
		24	1.42	0	0	12.96	
		48	2.63	0	0	23.98	
Cattle	Guanylic acid	5	+	0	0	+	0
		24	3.82	0	0	34.86	0
		48	5.15	0	0	47.00	0

nucleosidase were closely related in many points, besides their action on the same glucosidic linkages between purine bases and ribose. The activity of the enzyme under discussion increased as nucleosidase was purified by the Euler and Brunius method. The quantities of nucleosidase in tissues run parallel with those of the other. The tissues which produced the ester in larger amount showed stronger activity of nucleosidase (see Chapter III). The tissues, such as pig and cattle pancreas, which lacked in nucleosidase lacked also in the enzyme under discussion; the ester was never produced. The optimum hydrogen-ion concentration for the enzyme under discussion was same as that of nucleosidase; it was pH 7.5 (Table V). The further purification of these two enzymes may settle the problem of their specificity.

III. *Hydrolysis of nucleotides by rabbit tissues.*

It has been mentioned in the preceding chapter that the same tissue, pancreas, behaved quite differently towards nucleotides as the species of animals varied. It will be dealt in this chapter with the hydrolysis of guanylic and xanthylic acids by various

TABLE V.

Optimum Hydrogen-Ion Concentration for Production of Ribosephosphoric Ester from Guanylic Acid.

Experimental conditions have been described in Chapter I.

Enzyme source was dog pancreas.

pH (Boric acid- borax buffer)	Time (hours)	Inorg. P (mg.)	Ester (mg.)	Free ribose (mg.)	Guanosine (mg.)
7.0	5	0.07	7.87	±	0.70
	24	0.73	94.75	2.54	0.87
7.5	5	0.08	7.87	±	0.80
	24	0.78	148.40	2.70	1.56
8.0	5	1.36	±	±	12.41
	24	2.47	126.44	3.31	17.73

tissues of the same animal, rabbit. The results of hydrolysis of these acids by small intestine, kidney, liver and muscle are summarised in Table VI. The formation of ribosephosphoric ester and inorganic phosphate was most noticeable in small intestine, then kidney, liver and muscle in the order named. The velocities of the

TABLE VI.

Hydrolysis of Guanylic and Xanthylic Acids by Rabbit Tissues.

Experimental conditions have been described in Chapter I.

Time of incubation was 24 hours.

Tissue	Substrate	Inorg. P (mg.)	Ester (mg.)	Free Ribose (mg.)	Nucleoside (mg.)
Small intestine	Guanylic acid	18.25	98.98	51.02	70.26
	Xanthylic acid	17.00	89.40	49.04	62.66
Kidney	Guanylic acid	9.58	89.34	33.74	23.74
	Xanthylic acid	10.42	69.01	36.00	27.20
Liver	Guanylic acid	2.64	48.38	10.33	4.59
	Xanthylic acid	2.74	39.92	9.47	7.14
Muscle	Guanylic acid	±	23.45	3.34	0
	Xanthylic acid	0.53	38.51	1.56	1.90

decomposition of guanylic and xanthylic acids were approximately of the same order. The kidney tissue which was put under the Erdtman method of the phosphatase purification lost nucleosidase and the enzyme for the ester production.

The hydrolysis of guanylic acid was accompanied by the production of ammonia which was most marked in small intestine. Liver liberated ammonia in moderate quantities. On the other hand the formation of ammonia in kidney and muscle was decidedly low (Table VII). Hydrolysis of guanosine by small intestine and liver was followed by the production of ammonia, whilst no more than a trace of ammonia was found in kidney and muscle (Table VIII). These findings seem to indicate again that ammonia is not necessarily formed from the intact guanylic acid as the preliminary

TABLE VII.

Production of Ammonia from Guanylic Acid by Rabbit Tissues.

Experimental conditions have been described in Chapter I.

Time of incubation: 24 hours.

Tissue	Ester (mg.)	Ammonia formed (mg.)
Small intestine	88.22	6.55
Kidney	62.11	0.35
Liver	48.97	2.83
Muscle	37.11	0.14

TABLE VIII.

Hydrolysis of Guanosine by Rabbit Tissues.

In 25 cc.:

25 mg. of guanosine. 5 cc. of tissue extracts. 1 cc. of toluene.

pH 7.5. 37°C. 13 hours.

Tissue	Liberation of ribose		Production of ammonia (mg.)	
	mg.	%	Found	Calculated
Small intestine	6.77	51.8	0.62	0.76
Kidney	4.50	34.0	0.01	0.51
Liver	3.45	26.0	0.30	0.39
Muscle	3.25	24.5	0.02	0.36

condition for the disruption of the glucosidic union of the nucleotide. On comparing the results in Table VI or VII, and VIII it will be noticed that the nucleosidase content of the tissues runs parallel with that of the enzyme which produces the ester.

SUMMARY.

1. Dog pancreas was capable of disrupting the glucosidic linkages of riboguanlylic and xanthylic acids producing ribosephosphoric ester, while it exerted rather a weak hydrolyzing action on the ester linkage of the nucleotides. A small quantity of ammonia was formed from guanylic acid. However, when the purified enzyme was used, the production of the ester from guanylic acid took place without the simultaneous deamination of the guanine-nucleus of the molecule. Thus the disruption of the glucosidic linkage of guanylic acid took place without any previous change of the molecule, such as deamination or dephosphorylation. The optimum hydrogen-ion concentration for the ester formation was pH 7.5. Contrary to the classical statement, dog pancreas contained nucleosidase; it hydrolyzed guanosine and xanthosine. A small quantity of ammonia was produced when guanosine was hydrolyzed by the fresh extract, while the purified enzyme did not deaminate the substrate.

2. Cat pancreas was also able to produce the ester from nucleotides and to hydrolyze nucleosides. Deaminase was active in this organ; ammonia was produced from guanylic acid and guanosine at high rates.

3. Pancreas of cattle and pig possessed nucleophosphatase but lacked in nucleosidase, deaminase and the enzyme which produced the ester from nucleotides.

4. Liver, muscle, kidney and small intestine of rabbit contained the enzymes which detached both unions of the nucleotides. Hydrolysis of guanylic acid by small intestine and liver was accompanied by deamination of the guanine-nucleus, while the ester was produced from guanylic acid by kidney and muscle practically without liberating ammonia. Hydrolysis of guanosine by small intestine and liver was followed by the production of ammonia, but

not in the case of kidney and muscle.

5. It is suggested that the enzymic hydrolysis of nucleotides by tissues can take place in at least two ways. The one is, as has hitherto been assumed, the primary detachment of the ester linkage, and the subsequent hydrolysis of nucleosides thus formed. The other begins with the disruption of the glucosidic linkages which is followed by the decomposition of the ribosephosphoric ester.

REFERENCES.

- Euler, H. and Brunius, E. (1927): *Ber. deutsch. chem. Ges.*, **60**, 1584.
 Ishikawa, H. (1935): *J. Biochem.*, **22**, 385.
 Jones, W. (1911): *J. Biol. Chem.*, **9**, 169.
 Klein, W. (1935): *Z. physiol. Chem.*, **231**, 125.
 Levene, P. A. and Dmochowski, A. (1931): *J. Biol. Chem.*, **93**, 563.
 Levene, P. A. and Medigreceanu, F. (1911 i): *J. Biol. Chem.*, **9**, 65.
 Levene, P. A. and Medigreceanu, F. (1911 ii): *J. Biol. Chem.*, **9**, 389.
 Levene, P. A. and Weber, I. (1924 i): *J. Biol. Chem.*, **60**, 707.
 Levene, P. A. and Weber, I. (1924 ii): *J. Biol. Chem.*, **60**, 717.
 Parnas, J. K. and Heller, J. (1924): *Biochem. Z.*, **152**, 1.
 Schmidt, G. (1931): *Klin. Wschr.*, **10**, 165.
 Schmidt, G. (1932): *Z. physiol. Chem.*, **208**, 185.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XIV. A few modifications of the Zuckerkandl and Messiner-Klebermass method for determination of glucosamine and distribution of glucosaminase among bull tissues.

By

KUNIICHI WATANABE.

(From the Medico-chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, February 7, 1936)

I. ON THE ANALYTICAL METHOD.

The Zuckerkandl and Messiner-Klebermass method (1931) requires a great deal of skill to obtain precise and reproducible results, so that Elson and Morgan (1933) devised a new method based on a similar principle i.e. conversion of glucosamine into a pyrrole derivative and condensation of the latter with *p*-dimethylaminobenzaldehyde.

The original method of the former authors, however, has been proven to be made easy and fairly accurate if a few points are modified as seen in the following.

Apparatus.

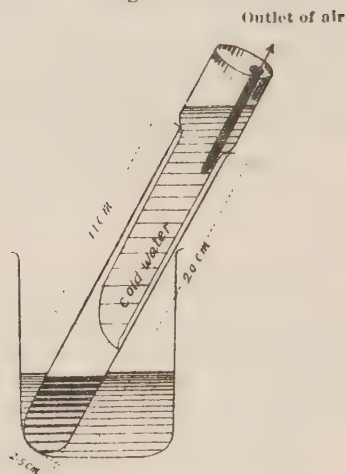
The loss of vapour from the acetylglucosamine solution when the latter is heated with alkali is avoided by a small condensor which is of the size seen in the accompanying figure.

Reagents.

Original reagents were employed, except that the artificial standard of Kawabe (1934, 1) was employed for colour comparison and 5% sodium methylate solution was substituted by sodium methylate alcoholate solution. The latter is prepared as follows:

Ethylalcohol is dried by the procedures adopted by Kawabe

Fig. 1.



in case of methanol and 4.5 gm. of sodium metal is dissolved first in methanol, made up with it to 60 cc. and finally with ethanol to 90 cc.

Procedures.

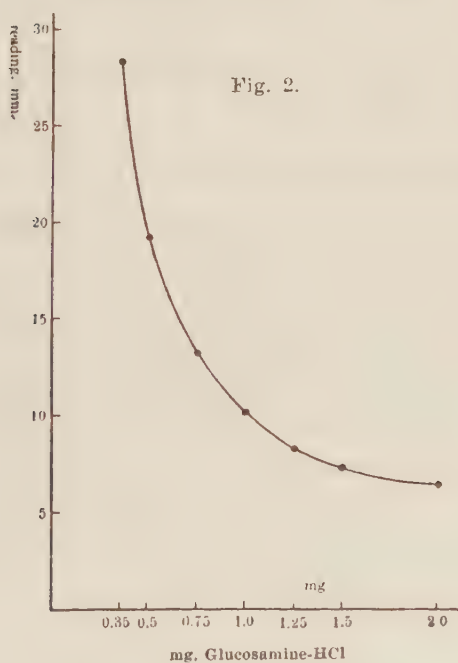
The solution which contains 0.35–2 mg is pipetted into a porcelain dish, and evaporated on a steam bath and the residue is treated with 1 cc. of 5% sodium methylate alcoholate solution by scratching it with a glass rod. The room temperature should be at 20°C. or higher, otherwise it is not perfectly dissolved. It is then stood for longer than 5 minutes, mixed well with 0.3 cc. of acetic anhydride, and allowed to stand again for longer than 5 minutes. After being transferred into a glass tube with water and alcohol to which is added 30% KOH, according to the original description, it is placed in water at 20°C. for 10 minutes and the dehydration is carried out by heating the solution exactly for 1½ minutes in boiling water, fixing the small condensor in the test tube and keeping the water level just above that of the solution. The test tube is then cooled and kept in water at 20°C. for 10 minutes, Ehrlich's reagent is added and placed again in the same water for a further 5 minutes, whereupon the intensity of the colour deve-

loped is measured by means of a colorimeter. The artificial standard is set at 15 mm. and the colour comparison must be finished in 5 minutes.

The amount of glucosamine in terms of the chlorhydrate is read directly from the curve which is empirically obtained. (Table I. Fig. 2)

TABLE I.

Amount of glucosamine chlorhydrate mg	Reading mm
0.35	28.27
0.50	19.14
0.75	13.04
1.00	10.13
1.25	8.22
1.50	7.12
2.00	6.23



REMARKS.

1. Duration of heating of the acetylglucosamine solution with alkali:—The best yield of the oxazole derivative (Morgan and Elson, 1934) is obtained by heating the reaction mixture for $1\frac{1}{2}$ to 2 minutes. When heated longer, the product is decomposed.

2. 5% sodium methylate solution was replaced by the methylate alcoholate solution because methanol is so volatile that the volume of the heated solution is not kept constant and when, on the other hand, sodium is dissolved in ethyl alcohol alone, the yellow colour which appears by heating disturbs the colour comparison.

3. The colour development arrives at the maximal intensity at the 5th minute after addition of Ehrlich's reagent and remains constant for 5 minutes.

4. The variation of sodium concentration in the methanol ethanol mixture does not affect the colour development within the limits from 4 to 5.5%.

5. The test is sensitive to so small a quantity as 0.05 mg of glucosamine chlorhydrate.

II. ON THE DISTRIBUTION OF GLUCOSAMINASE.

The observations on the distribution of glucosamine among bull tissues by means of the above analytical procedures are tabulated below. The experimental conditions on the fresh bull tissues are similar to those adopted by Kawabe (1934, 2).

Liver, lung, pancreas and kidney contain comparatively much quantity of the enzyme as was seen in the rabbit tissues by Kawabe, while spleen, thyroid gland, muscle and cortex of suprarenal capsule have a minute quantity or are devoid of it completely.

The expenses of this work were defrayed by a grant from the Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan, which is gratefully acknowledged.

TABLE II.

Tissue pulp: 2 gm.
 Glucosamine chlorhydrate: 36 mg.
 Initial total volume of the mixture: 12 cc.

Tissue	Glucosamine remained uncovered in terms of the chlorhydrate in 0.5 cc of the digestion mixture (mg).				
	0	1	3	5	10
	(Hours of incubation at 38°C)				
Liver	1.50	1.49	1.43	1.40	1.33
Lung	1.49	1.39	1.35	1.30	1.28
Heart	1.51	1.48	1.42	1.39	1.38
Pancreas	1.49	1.35	1.34	1.32	1.31
Cerebrum	1.50	1.48	1.44	1.41	1.40
Kidney	1.50	1.44	1.38	1.32	1.30
Spleen	1.49	1.48	1.48	1.48	1.48
Thyroid gland	1.50	1.48	1.47	1.47	1.47
Mucosa of small intestine	1.51	1.49	1.43	1.40	1.34
Ovary	1.50	1.43	1.40	1.37	1.35
Gl. submaxillaris	1.50	1.34	1.33	1.32	1.27
Skelet muscle	1.51	1.50	1.51	1.51	1.51
Cortex of suprarenal capsule.	1.49	1.49	1.49	1.49	1.48

REFERENCES.

- Elson, L. A. and Morgan, W. T. J. (1933): *Biochem. Journ.*, **22**, 1824.
 Kawabe, K. (1934, 1): *Journ. Biochem.*, **19**, 319.
 „ (1934, 2): *Journ. Biochem.*, **20**, 233.
 Morgan, W. T. J. and Elson, L. A. (1934): *Biochem. Journ.*, **28**, 989.
 Zuckerkandl, F. and Messiner-Klebermass, L. (1931): *Biochem. Zeits.*, **236**, 19.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XV. A modified Zuckerkandl and Messiner-Klebermass method for determination of *N*-mono-acetylglucosamine and its application to biochemical analysis.

By

KUNIICHI WATANABE.

(From the Medico-chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, March 7, 1936)

I. MODIFICATIONS OF ZUCKERKANDL AND MESSINER-KLEBERMASS METHOD.

The Zuckerkandl and Messiner-Klebermass method (1931) is usual only in a rough measurement as Morgan and Elson (1934) mentioned. The analytical conditions were, therefore, scrutinized and the following improvements were made to render it suitable for obtaining accurate results, although the limits of the measurable amount were much reduced thereby.

Apparatus.

On the small condensor devised for use in dehydration of acetylglucosamine, see the foregoing communication (Watanabe 1936).

Reagents.

1. 29.3% sodium acetate solution.
2. absolute ethanol (Watanabe 1936).
3. 30% KOH solution.
4. Ehrlich's *p*-dimethylaminobenzaldehyde solution.
5. Kawabe's artificial standard for colour comparison, (Kawabe 1934).

Procedures.

1 cc. of the solution containing 0.35 to 2.0 mg of *N*-monoacetylglucosamine is pipetted into a test tube, to which is added 1 cc. of sodium acetate solution, 0.5 cc. of water and 2 cc. of alcohol, or when the solution has less of the substance, a larger volume is dried up in a small porcelain dish on a bath and the residue is transferred quantitatively into a test tube with 1 cc. of sodium acetate solution, 1.5 cc. of water and 2 cc. of alcohol. The mixture is heated in boiling water, by following the direction in glucosamine analysis Watanabe (1937) after addition of 0.5 cc. of KOH solution, exactly for 1 minute and a half, whereupon it is plunged quickly into water at 20°C and let stand in it for 10 minutes. 3 cc. of Ehrlich's reagent is then run into the tube from a burette and colour comparison is made after the mixture is kept again in the water for the same duration. The height of the stable artificial standard is 15 mm. The colour intensity developed is not a straight line function of the amount taken for analysis but follows the colorimetric readings given below from which the curve in fig. 1 is plotted.

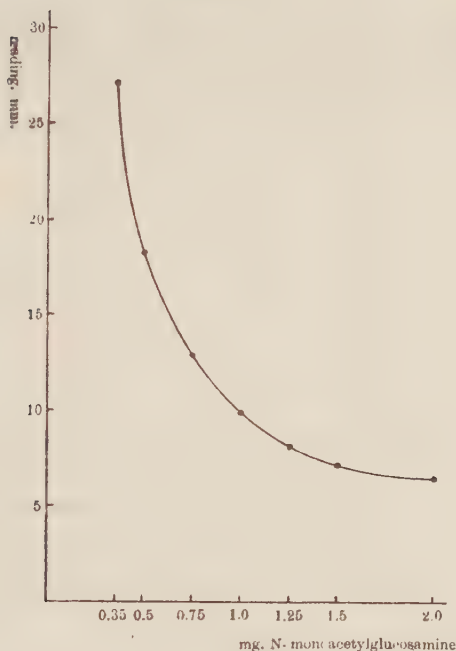
TABLE I.

<i>N</i> -monoacetylglucosamine mg	Reading. mm
0.35	27.2
0.5	18.3
0.75	12.9
1.0	9.9
1.25	8.0
1.5	7.2
2.0	6.4

Notes.

1. *N*-monoacetylglucosamine applied was prepared according to Zuckerkandl and Messiner-Klebermass, by increasing the quantity of acetic anhydride to 4 mols from 2 mols. The product melted at 203°C after browning at 190°C.

Fig. 1.



2. In the original method, the dehydration of *N*-monoacetylglucosamine is performed by boiling the reaction mixture roughly for a short time. But as the time of heating is an important factor, effective on the yield of the oxazole derivative, and furthermore it is very difficult to determine the commencement of boiling precisely, the reaction mixture was heated for a longer duration at a constant temperature as described above. The best yield of the oxazol derivative is attained when *N*-monoacetylglucosamine is heated for $1\frac{1}{2}$ to 2 minutes, otherwise it remains unconverted or the product once formed is destroyed as given in table II. The writer preferred $1\frac{1}{2}$ minutes, because 2 minutes heating produces a yellow tint when large quantities, for instance, 2 to 3 mg of the substance are treated.

3. Both the rate and intensity of colour development increase rapidly with the temperature. The boiled reaction mixture was

TABLE II.

The influence of time of heating on the colour development.
Analysed quantity of *N*-monoacetylglucosamine: 1 mg.

Time of heating. Sec.	Reading. mm
40	21.2
45	13.8
60	11.8
90	9.9
105	9.8
120	9.9
150	10.5
180	12.7

therefore brought to 20°C by placing in water at this temperature before addition of Ehrlich's reagent, which was found to require 9 minutes, and at this temperature, the maximal colour intensity was reached at the 10th minute after addition of the aldehyde reagent and remained constant for 5 minutes as given in table III.

TABLE III.

The rate of colour development at 20°C after addition of Ehrlich's reagent.
N-monoacetylglucosamine analysed: 1 mg.

Time after addition of Ehrlich's reagent. Min.	Reading. mm
5	12.5
10	9.9
12.5	9.8
15.0	9.9
20.0	10.4
25.0	11.7

4. 0.05 mg of *N*-monoacetylglucosamine can be detected by this modification method and the colour developed is much more intensive than that by the original procedures.

5. By this method even very dilute solution can be analysed, because the solution is previously dried up when necessary.

II. BIOCHEMICAL APPLICATION.

N-monoacetylglucosamine was found to be recovered from urine, tissue and blood quantitatively by combining the above procedures with those of Kawabe for analysis of glucosamine in these biological materials as table IV indicates.

TABLE IV.

Blood.			
Volume of rabbit blood taken for analysis. cc.	<i>N</i> -monoacetylglucosamine.		
	Added. mg	Recovered.	
		mg	%
2	2	1.96	98
2	2	1.96	98
2	1	1.0	100
Tissue.			
Weight of rabbit liver taken for analysis. gm.	<i>N</i> -monoacetylglucosamine.		
	Added. mg	Recovered.	
		mg	%
0.5	2	2.0	100
0.3	3	2.99	99.6
0.5	3	2.99	99.6
0.5	1	1.002	100.2
Urine.			
Volume of urine taken for analysis. cc.	<i>N</i> -monoacetylglucosamine.		
	Added. mg	Recovered.	
		mg	%
1	4	4	100
1	4	3.92	98
1	6	6	100
1	2	2.00	100
1	2	2.00	100

I wish to thank the Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan for a grant to defray the expense of this research.

REFERENCES.

- Kawabe, K. (1934): Journ. Biochem., **19**, 319.
Morgan, W. T. J. and Elson, L. A. (1934): Biochem. Journ., **28**, 988.
Watanabe, K. (1936): Journ. Biochem., **23**, 349.
Zuckerkindl, F. and Messiner-Klebermass, L. (1931): Bioch. Z., **236**, 19.

FORSCHUNG ÜBER DIE SERUMREAKTION DER LEPRA.

Über das Reagens einer Fällungsreaktion des Lepraserums.

VON

IHOE SAKAKIBARA.

(Aus dem Biochemischen Institut der Medizinischen Akademie Kumamoto.

Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.)

(Eingegangen am 4. März 1936)

VORWORT.

Nachdem Wassermann (1906) die Komplementbindungsreaktion des syphilitischen Serums entdeckt hatte, gebrauchte Eitner (1906) als Antigen die Kochsalzlösungsemulsion der Lepraknoten und der Normalhaut und untersuchte nach den Methoden von Wassermann die Komplementbindungsreaktion beim Lepraserum. Bei erster erzielte er ein positives, bei letzterer ein negatives Resultat.

Wechselmann und Meier (1908) nahmen als Antigen wässrige Emulsion der Leber des syphilitischen Fötus und wässrige Emulsion des Herzens gesunder Menschen, untersuchten die Komplementbindungsreaktion des Lepraserums und erzielten ein positives Ergebnis.

Porges und Meier (1908) wählten Lecithin als Antigen und stellten die Komplementbindungsreaktion des syphilitischen Serums als positiv fest.

Seither glaubt man, dass das Lecithin eine spezifische Beziehung zum Syphilisserum habe.

Teruuechi und Toyoda (1909) gebrauchten Cuorin und Lecithin als Antigen und stellten die Fällungsreaktion des Syphilisserums als positiv fest. Mitsuda (1909) erhielt mit demselben Antigen positives Resultat bei Lepraserum; doch Tsurumi (1911)

behauptet, dass zwischen Lepra-Serum und Lecithin oder Cuorin keine Fällungsreaktion hervorgerufen wird. Kagawa (1913) gebrauchte als Antigen eine kolloidale Lösung von Lecithin von Sankyo- und von Tomoda-Präparat und stellten die Trübungsreaktion des Lepra-Serums als positiv fest, jedoch bei dem Sankyo'schen Präparat schwach und beim Tomoda'schen verhältnismässig stark.

Sakurai (1926) gebrauchte Lecithin und Cuorin, um die Komplementbindungs- und Fällungsreaktion des Lepraserums zu untersuchen; bei der letzteren zeigte sich mit Lecithin 85,7%, mit Cuorin 96% positiv. Fast zur gleichen Zeit untersuchte Nojima (1930) die Komplementbindungsreaktion des Lepraserums mittelst wässriger Emulsion des Cholesterins und des alkoholischen Extraktes einiger Eingeweide von Leprakranken oder des Lepraknotens als Antigen, und erzielte ein positives Resultat. Mit derselben Emulsion als Antigen erzielte er bei der Fällungsreaktion eine höhere Positivität. In letzter Zeit haben Toyama (1930) mit Miyoshi (1930) und Kubokawa (1930) als Antigen eine Mischung von Eier-Lecithin (Sankyo-Präparat) und alkoholischem Extrakt der menschlichen Peripherienerven gebraucht, die Komplementbindungs- und Fällungsreaktion des Lepraserums untersucht und ein spezifisch positives Resultat erreicht.

Aus obigen Versuchen vieler Autoren wird klar, dass Lecithin eine spezifische Stellung zum Lepraserum hat, es fehlt aber noch die vollkommene Klärung der wesentlichen Natur des Antigens für Lepraserum.

Um zu erforschen, ob die Reaktion zwischen dem Lepraserum, Lecithin und Nervenextrakt durch das Lecithin allein oder dessen Abbauprodukt oder eine andere im Lecithin enthaltene Substanz oder durch irgendeine Substanz des Nervenextraktes hervorgerufen wird, habe ich Untersuchungen angestellt und will hier nun die Ergebnisse veröffentlichen.

EXPERIMENTE.

Kubokawa (1930) mischte zur alkoholischen Lösung des Eier-Lecithins (Sankyo-Präparat) alkoholischen Extrakt der men-

schlichen Peripherienerven, konzentrierte die Mischung, brachte sie schnell in physiologische Kochsalzlösung und schüttelte. Diese so erhaltene Lösung gebrauchte er als Reagenz und erzielte damit eine höchst positive Fällungsreaktion des Lepraserums. Ich (1935) prüfte das Experiment nach und nun beschäftigte mich damit, um von verschiedenen Standpunkten dieses Reagens genau zu prüfen.

I. HERSTELLUNGSMETHODE DES REAGENS.

Die Mischung von 10 cem alkoholischen Extraktes menschlicher Peripherienerven und 1% alkoholische Eier-Lecithin (Sankyo-Präparat)-Lösung werden auf dem Wasserbad bis auf 5 cem konzentriert und dann unter leichtem Schütteln tropfenweise in 30 cem physiologische Kochsalzlösung von 17°C gebracht; die entstandene kolloidale Lösung wird 24 Stunden bei 56°C stehen gelassen, so erhält man ein Reagenz. Die Resultate der Fällungsreaktion mit dieser und des nach Kubokawa'scher Methode gefertigten Reagenz zeigt Tabelle I.

TABELLE I.

Reagenz		nach Kubokawa	nach meiner-Methode	nach 4 Stunden beobachtet
Serum				
Lepra	M.M.	+	+	
	T.S.	+++	+++	
	I.G.	-	-	
	O.N.	-	-	
Gesunde	A.M.	-	-	
	A.U.	-	-	
	S.Y.	-	-	
	I.S.	-	-	

Die Positivität des Lepraserums und die Stärke des Reaktion zeigten bei beiden keinen Unterschied, beim Gesundenserum waren beide negativ.

Beide Reagenzien wurden je in einen Em-Kolben getan, gut verkorkt und in Zimmertemperatur stehen gelassen. Bei den nach

Kubokawa hergestellten Reagenz begann sich schon nach 3 Tagen eine Fällung zu bilden, und nach 5 Tagen bemerkte man am Kolbenboden und -wand eine grosse Menge der Fällung, bei der eigenen jedoch konnte man nach 7 Tagen nur eine geringe Fällung beobachten. Wenn man also das Reagenz eine verhältnismässig lange Zeit gebrauchen will, ist die Herstellung nach meiner Methode besser.

Die oben erwähnten Resultate wurden nach 4 Stunden festgestellt, und es gab zwischen beiden keinen Unterschied, doch ergab sich bei der Beobachtung des Reaktionszustandes in mehreren Zeitabschnitten nach Beimischen folgendes Resultat, welches zeigt, dass das Auftreten der Fällung durch das Reagenz nach Kubokawa's Methode verhältnismässig schneller ist.

TABELLE II.

Serum		Reagenz				nach Kubokawa				nach meiner Methode			
						30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'
Lepra	Y.U.	±	++	++++	++++	±	++	+++	++++	±	++	+++	++++
	I.D.	±	++	++++	++++	—	±	+	++++	—	±	+	++++
	U.D.	++	++++	++++	++++	±	++	++++	++++	±	++	++++	++++
	H.S.	++	++++	++++	++++	+	++	++++	++++	+	++	++++	++++
	I.H.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gesunde	I.S.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	K.T.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

II. ÜBER DAS MATERIAL DER REAGENZIEN.

Als Reagenzmaterial muss man, wie Kubokawa ausführt, die Peripherienerven gesunder Menschen und Eier-Lecithin (Sankyo-Präparat) gebrauchen; doch um zu untersuchen, ob man nicht auch andere Mittel verwenden könne, hat der Verfasser folgende Versuche aufgestellt.

a) Über den Nervenextrakt. Zuerst verwendete der Verfasser als Material die N. peroneus und tibialis eines amputierten Unterschenkels von einem Unterschenkelgeschwürkranken (nicht

leprös). Weil es aber sehr schwer ist, immer eine genügende Menge von Peripherienerven gesunder Menschen bekommen zu können, verwendete ich nächst dem dieselben Nerven eines amputierten Unterschenkels eines Leprakranken, und erzielte folgende Resultate:

TABELLE III.

Reagenz Serum		Sankyo-Lecithin + Nervenextrakt	
		Nervenextrakt	
		des Gesunden	des Leprösen
Lepra	M.M.	+++	+++
	S.K.	—	—
	O.W.	—	—
	A.G.	+++	+++
	F.S.	++	++
	T.S.	—	—
	A.B.	+	+
	N.O.	—	—
Gesunde	I.S.	—	—
	A.U.	—	—
	S.Y.	—	—
	K.U.	—	—
	K.T.	—	—

Wie die Tabelle zeigt, war die Reaktion bei beiden Reagenzien gleich.

Ferner gebrauchte der Verfasser statt Peripherienerven von Menschen, Kaninchenhirn oder den Nervus ischiadicus des Kaninchens und machte folgende Experimente, wie Tabelle IV zeigt.

Die Resultate der Reagenzien aus Kaninchen-Peripherienerven und Lecithin waren ganz dieselben wie bei denen aus menschlichen Peripherienerven und Lecithin, jedoch bei der aus Kaninchenhirn und Lecithin war die Positivität gering und die Reaktionsstärke schwach; sie stimmten mit der Positivität beim Gebrauch von Peripherienerven des Kaninchens nicht überein, auch zeigten sie

TABELLE IV.

Reagenz Serum		Sankyo-Lecithin +		
		Nervenext. Menschen	Nervenext. Kaninchen	Hirnext. Kaninchen
Lepra	M.M.	+++	+++	—
	S.K.	—	—	+
	O.W.	—	—	—
	A.G.	+++	+++	++
	F.S.	++	++	+
	T.S.	—	—	—
	A.B.	+	+	+
	N.O.	—	—	—
Gesunde	I.S.	—	—	—
	A.U.	—	—	—
	S.Y.	—	—	+
	K.U.	—	—	+
	K.T.	—	—	—

überdies manchmal im gesunden Serum positive Fälle, es ist also schwer, im Lepraserum die Spezifität hervorzurufen.

Nach diesen Versuchen ist es mir klar,⁶ dass man statt der Peripherienerven gesunder Menschen auch die von Leprakranken oder von Kaninchen gebrauchen kann und ich habe im Folgenden hauptsächlich diese beiden Nerven gebraucht.

b) Über das Lecithin. Kubokawa meint, dass das Sankyo'sche Lecithin für dieses Reagenz am geeignetsten sei. Der Verfasser gebrauchte das Sankyo'sche Eier-Lecithin, das Merck'sche Ovo-Lecithin und das nach Sueyoshi's Methode (1931) selbst hergestellte Eigelb-Lecithin, bereitet das Reagenz und untersuchte die Fällungsreaktion.

Die Fällungsreaktion war bei allen drei Reagenzien, wie die Tabelle zeigt, im gesunden Serum negativ; im Lepraserum war die Positivität aller drei gleich, doch die Reaktionsstärke war beim Reagenz mit Merck'schem Lecithin schwächer als bei dem mit Sankyo'schem, und am schwächsten war sie mit reinem Lecithin.

TABELLE V.

Reagenz Serum		Nervenextrakt + Lecithin		
		Lecithin		
		Sankyo	Merck	in Laboratorium dargestellt
Lepra	T.S.	+++	++	+
	M.M.	+++	+++	+++
	H.G.	++	+	+
	H.D.	++	++	+
	K.S.	—	—	—
	N.Y.	++	+	+
	K.T.	—	—	—
	M.M.	+	+	+
Gesunde	I.S.	—	—	—
	A.U.	—	—	—
	H.T.	—	—	—
	S.Y.	—	—	—

Aus diesen Experimenten ersieht man, dass die Reaktion je nach der Lecithin-Art Unterschiede aufweist.

Die analytischen Resultate dieser 3 Arten des Lecithins sind folgende:

TABELLE VI.

Lecithin-Präparat	Gesamt-N : NH ₂ -N	P : N
Sankyo	100:35,57	1:0,99
Merck	100:28,13	1:1,20
in Laboratorium dargestellt	100: 4,13	1:1,10

III. ÜBER DIE KONZENTRATION DER REAGENZIEN.

Um festzustellen, welchen Einfluss die verschiedenen Konzentrationen des Lecithins und Nervenextraktes auf die Reaktion haben, hat der Verfasser das Reagenz, dessen Konzentration dem Kubokawa'schen Reagenz entspricht, (I-Lösung genannt), zwei-

und vierfacher konzentriert, und zwei-, fünf- und zehnfach verdünnt, also 6 Lösungen herstellt und die Zeit des Auftretens der Reaktion bei ein und demselben Serum beobachtet. Das gebrauchte Lecithin war Sankyo's Eier-Lecithin und nach Sueyoshi aus Eigelb selbstgefertigtes Rein-Lecithin, als Peripheriennerven wurde der Nervus ischiadicus gesunder Kaninchen, als Lepra-Serum das von Kranken mit stärkster positiver Reaktion verwendet. Die Reaktion wurde innerhalb von 4 Stunden zu bestimmten Zeiten beobachtet, und zur Kontrolle wurde gesundes Serum, das des Verfassers selbst, gebraucht. Die Herstellungsmethode des Reagenz war die Kubokawasche.

TABELLE VII.

Zeitdauer (Minuten)								
Reagenz		10	15	20	30	50	180	240
Art	Konzentration							
Rein-Lecithin + Nervenex.	4 mal konzentrierte	+	+	++	++	+++	+++	++++
	2 „ „	+	+	++	++	+++	+++	++++
	1-Lösung	+	+	++	++	+++	+++	++++
	2 mal verdünnte	+	+	++	++	+++	+++	++++
	5 „ „	-	+	+	+	++	+++	+++
	10 „ „	-	±	+	+	++	+++	+++
Sankyo-Lecithin + Nervenex.	4 mal konzentrierte	+	+	++	++	+++	+++	++++
	2 „ „	+	+	++	++	+++	+++	++++
	1-Lösung	+	+	++	++	+++	+++	++++
	2 mal verdünnte	+	+	++	++	+++	+++	++++
	5 „ „	-	+	+	+	++	+++	++++
	10 „ „	-	±	+	+	++	+++	++++

Aus dem Resultat ersieht man, dass die zwei- und vierfach erhöhte Konzentration keinen Einfluss auf die Zeit des Auftretens der Reaktion ausübt, und auch das zweifach verdünnte Reagenz verursachte keine Verzögerung des Auftretens. Bei der fünf- und zehnfachen Verdünnung jedoch beobachtete man eine Verzögerung desselben, und dies geschah in gleicher Weise sowohl beim Sankyo-

Lecithin, wie auch beim Rein-Lecithin. Beim Kontrollserum zeigten alle negative Reaktion. Der Tabelle nach zeigt sowohl das Sankyo-Lecithin wie auch das Reinecithin die gleiche Stärke der Reaktion; dies kommt wohl daher, dass das gebrauchte Serum solches mit sehr starker Reaktionsstärke war. Es zeigte sich aber ein Unterschied der Stärke der Reaktion beim Gebrauch von Serum mit verhältnissmässig schwacher Reaktionsstärke. Das wird in der nächsten Tabelle gezeigt:

TABELLE VIII.

Reagenz Serum	Lecithin							
	Sankyo				im Laboratorium dargestellt			
	30'	60'	120'	240'	30'	60'	120'	240'
M.D.	+	++	++	+++	—	+	++	+++
I.D.	—	±	+	++	—	—	+	++

IV. ÜBER DEN GEBRAUCH DES PERIPHERIE-NERVEN-EXTRAKTES ODER DES LECITHINS ALLEIN.

Um herauszufinden, welches von Peripherie-Nerven-Extrakt und Lecithin im Reagenz die Hauptrolle bei der Reaktion spielt, hat der Verfasser die folgenden Reagenzien bereitet und die Reaktion auf das Lepraserum versucht.

Reagenzien:

1) 15 cem alkoholischer Extrakt des Ischiadicus des Kaninchens wurde auf 5 cem konzentriert, 30 cem physiologischer Kochsalzlösung beigemischt.

2) 15 cem alkoholischer Extrakt menschlicher Peripherie-Nerven wurde auf 5 cem konzentriert, 30 cem physiologischer Kochsalzlösung beigemischt.

3) 5 cem 1% alkoholisches Lecithin (Sankyo'sches Präparat)-Lösung wurde mit 10 cem Peripherienerven-Alkohol-Extrakt gemischt, auf 5 cem konzentriert, mit 30 cem physiologischer Kochsalzlösung gemischt.

4) 10 cem 1% alkoholische Lecithin (Sankyo's-Präparat)-

Lösung wurde auf 5 cem konzentriert, mit 30 cem physiologischer Kochsalzlösung gemischt.

Die Reagenzien 1) und 2) sind milchig getrübbte Lösungen, und nach 5–6 Stunden Aufbewahrung in Zimmertemperatur zeigte sich weisser, feinkörniger Niederschlag. 3) und 4) waren hellgelbe Lösungen, und in Zimmertemperatur gestellt, zeigte sich 5 Tage lang ein kolloidaler Zustand. Diese Reagenzien wurden, wie die oben erwähnten Experimente, 24 Stunden auf 56°C gebahrt.

TABELLE IX.

Reagenz Serum		Nervenextrakt			Sankyo-Lecithin (4)
		Kaninchen (1)	Menschen (2)	+ Sankyo-Lecithin (3)	
Lepra	M.M.	+	+	+++	++
	S.K.	+	+	—	—
	H.G.	+	+	+	+
	K.D.	—	—	—	—
	I.G.	+	+	—	—
	U.N.	+	+	—	—
	T.K.	+	+	—	—
	T.S.	++	++	++	+
	O.W.	++	++	—	—
Gesunde	A.M.	+	+	—	—
	A.U.	±	±	—	—
	S.Y.	+	+	—	—
	I.S.	+	+	—	—
	I.I.	—	—	—	—

Man ersieht aus Tabelle IX, dass beim Gebrauch von Nerven-Extrakt allein die Reaktion beim gesunden wie auch beim Lepra-serum positiv, also nicht spezifisch für die Lepra war. Im Gegensatz dazu war beim Gebrauch von Lecithin allein die Reaktion im gesunden negativ und im Lepra-serum positiv, und man sieht, dass es eine Spezifität für die Lepra hat; doch wenn man diese mit der aus Lecithin und Nerven-Extrakt bestehenden Reagenz vergleicht,

ist ihre Stärke geringer. Diese Tatsachen konnte man auch beim nach Sueyoshi (1931) hergestellten Lecithin, dass anstatt des Sankyo-Lecithins gebraucht wurde, feststellen.

Als man ferner Peripherie-Nerven des Menschen oder Kaninchens mit Alkohol extrahierte und in Zimmertemperatur (15°C) stehen liess, bildete sich nach 12 Stunden weisser Niederschlag. Dieser war in Aceton, Äther, Chloroform und Wasser fast unlöslich, in kaltem Alkohol löste er sich 0,5% und in heissem war er leicht löslich; doch bildete sich nach 12 Stunden in Zimmertemperatur weisser Niederschlag.

Der Verfasser wusch die Fällung je dreimal erst mit kaltem Alkohol und dann mit Äther, dann löste er sie in 0,7% heissem 80% Alkohol auf, mischte dies dem Lecithin bei, das wiederum physiologischer Kochsalzlösung beigegeben wurde, und machte daraus 5 Reagenzien, mit diesen untersuchte er die Fällungsreaktion auf das Lepraserum.

Reagenzien:

(1) 3 ccm alkoholische Lösung des Niederschlags aus dem Nervenextrakt wurde zu 1 ccm konzentriert und 6 ccm physiologischer Kochsalzlösung beigegeben.

(2) 2 ccm alkoholische Lösung des Niederschlags aus dem Nervenextrakt und 1 ccm 1% alkoholische Lecithin-Lösung wurden gemischt, zu 1 ccm konzentriert und 6 ccm physiologischer Kochsalzlösung beigegeben.

(3) 3 ccm Nervenextrakt wurden zu 1 ccm konzentriert und mit 6 ccm physiologischer Kochsalzlösung gemischt.

(4) 2 ccm Nervenextrakt und 1 ccm 1% alkoholische Lecithin-Lösung wurden gemischt, zu 1 ccm konzentriert und 6 ccm physiologischer Kochsalzlösung beigegeben.

(5) 3 ccm 1% alkoholische Lecithin-Lösung wurden zu 1 ccm konzentriert und mit 6 ccm physiologischer Kochsalzlösung gemischt.

Alle diese Reagenzien wurden gebraucht, nachdem sie 24 Stunden in einem Brutofen von 56°C gestanden hatten. 1) und 3) dieser Reagenzien bildeten 5-6 Stunden nach der Herstellung

feinkörnigen weissen Niederschlag. Wenn man schüttelte, wurde dieser vorübergehend homogen; doch nachdem er wieder 2-3 Stunden gestanden hatte, bildete sich zum zweiten Mal ein Niederschlag. Die mit Lecithin gemischten Reagenzien behielten ihren kolloidalen Zustand 5-6 Tage bei.

TABELLE X.

Reagenz Serum		(1) Niederschlag des Nervenex.	(2) Niederschlag des Nervenex. + Lecithin	Nervenex. (3)	(4) Nervenex. + Lecithin	(5) Lecithin
Lepra	S.T.	±	—	+	—	—
	M.M.	±	++	+	++	+
	T.S.	±	+	++	++	+
	I.G.	±	—	+	—	—
	O.W.	±	—	++	—	—
	Y.S.	±	+	+	+	+
	H.G.	±	+	+	++	+
Gesunde	A.M.	±	—	+	—	—
	A.U.	±	±	+	—	—
	S.Y.	±	—	+	—	—

Aus Tabelle X ersieht man, dass das durch Mischung des Niederschlags des Peripherie-Nerven-Alkoholextraktes mit physiologischer Kochsalzlösung entstandene Reagens (1) im Gesunden- und im Lepraserum eine Trübung hervorrief, durch welche man nicht wissen konnte, ob die Reaktion positiv war oder nicht. Der Zustand dieser Trübung ist verschieden von dem der Fällung der durch Lecithin hervorgerufenen Reaktion, man konnte nämlich die Körnchen nicht deutlich sehen.

Die Reaktion, die das durch Mischung des Niederschlags des Peripherienervenextraktes mit Lecithin hergestellte Reagenz (2) im Lepra-Serum hervorruft, ist fast gleich der Positivität der durch Lecithin allein (Reagenz 5) oder der durch Mischung von Lecithin mit Peripherienervenextrakt (Reagenz 4) erzeugten Reaktion, jedoch in der Stärke viel schwächer als die Reaktion, die durch Mischung von Lecithin mit Peripherienervenextrakt hervorgerufen

wurde, und beim Gesundenserum bei zwei von drei Fällen negativ, ein anderer Fall \pm . Darum stärkt der nach dem Erkalten von warmen alkoholischem Nervenextrakt entstandene Niederschlag nicht die spezifische Reaktion des Lecithins auf das Lepraserum, sondern macht je nach den Umständen die Reaktion undeutlich.

Die aus Kaninchen-Ischiadicus oder menschlichen Peroneus-Nerven bei 56°C mit Alkohol extrahierte Lösung (I) oder das, nachdem der Extrakt 48 Stunden in 0°C gestellt und der entstandene Niederschlag entfernt wurde, erhaltene Filtrat (II) wurde mit Sankyo'schem Lecithin vermisch, im physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und folgende vier Reagenzien hergestellt.

Reagenzien:

(1) 3 ccm alkoholische 1% Lecithin-Lösung mischte man mit 10 ccm Kaninchen-Nervenextrakt (I), konzentrierte die Mischung auf 5 ccm und löste sie in 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung auf.

(2) 5 ccm alkoholische 1% Lecithin-Lösung mischte man mit 10 ccm Filtrat (II) des Kaninchen-Nervenextraktes, konzentrierte die Mischung auf 5 ccm und löste sie in 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung auf.

(3) 5 ccm alkoholische 1% Lecithin-Lösung mischte man mit 10 ccm des menschlichen Nervenextraktes (1), konzentrierte die Mischung auf 5 ccm und löste sie in 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung auf.

(4) 5 ccm alkoholisch 1% Lecithinlösung mischte man mit 10 ccm Filtrat (II) des menschlichen Nervenextraktes, konzentrierte die Mischung auf 5 ccm und löste sie in 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung auf.

Die Herstellung geschah nach Kubokawa'scher Methode. Die Reaktionsresultate der Reagenzien auf die Seren waren folgende:

Überblick dieser Tabelle zeigt: Durch die Reagenzien 1, 2 u. 4 ist die Reaktion bei dem gesunden Serum negativ, bei dem Lepraserum in einigen Fälle positiv. Bei dem Reagenzien 2 u. 4 zeigt sich die Reaktion ganz gleich. Durch das Reagenz 1 bei den Fällen,

TABELLE XI.

Reagenz Serum		(1)	(2)	(3)	(4)
Lepra	S.K.	±	—	±	—
	M.M.	±	+++	+	+++
	I.B.	—	—	—	—
	T.S.	+++	++	++	++
	F.I.	—	—	±	—
	O.W.	—	—	±	—
	F.S.	—	—	—	—
Gesunde	I.S.	—	—	—	—
	M.N.	—	—	±	—
	H.T.	—	—	—	—

von welchen durch die Reagenzien 2 u. 4 ein Fall die negative, ein anderer die stark positive Reaktion zeigt, tritt die Reaktion \pm ein. Das Reagenz 3 nimmt bei einem gesunden Serum das Resultat \pm , bei 3 leprösen Seren, welche bei Reagenz 2 u. 4 das negative Resultat zeigen, auch das \pm . Ähnliches kann man beim Reagenz 1 sehen. Dieses deutet die Unspezifität des Reagenz 3 an. Wenn man also aus dem alkoholischen Peripherienervenextrakt den beim Erkalten entstandenen Niederschlag entfernt und dies Filtrat mit Lecithin vermischt, so reagiert das erhaltene Reagenz mit Lepraserum spezifisch und stärker, als das nicht so erhaltene. Also die weisse Substanz, welche im alkoholischen Nervenextrakt enthalten ist und sich beim Erkalten ausscheidet, schwächt die Reaktion und zerstört je nach dem Umstand die Spezifität.

V. ANALYSE DER REAGENZIEN.

Aus den obigen Experimenten wurde klar, dass die Phosphatide und die im Nervenextrakt enthaltenen, in kaltem Alkohol löslichen Substanzen solche sind, die bei der Entstehung der Fällungsreaktion mitwirken. Die ersteren spielen die Hauptrolle und die letzteren helfen mit.

Um festzustellen, aus welchen einzelnen Substanzen und aus

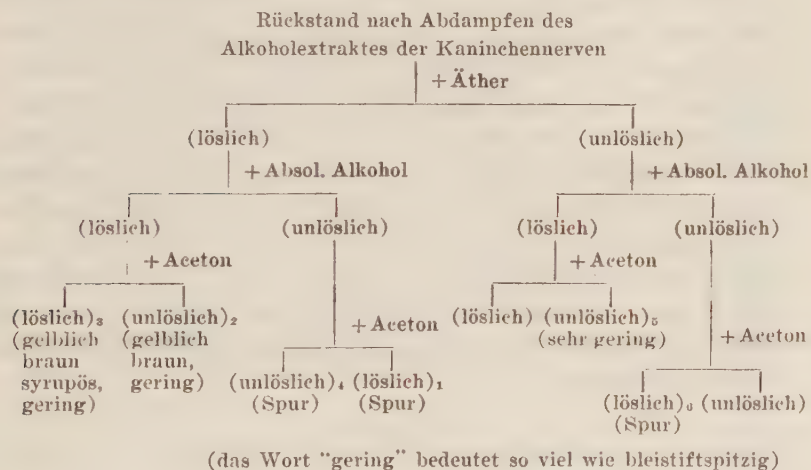
welcher Menge dieser Substanzen die Reagenzien hergestellt sind, hat der Verfasser die Analyse des Kaninchen Nervenextraktes und des Lecithins (Sankyosches Präparat) vorgenommen.

A. Analyse des Nervenextraktes.

a. Fraktionierung.

1 g Kaninchenerven wurde zu 30 cem 95% Alkohol gegeben und 18 Stunden bei 56°C extrahiert, 48 Stunden stehen gelassen und filtriert. Diese Behandlung ist dieselbe wie die Kubokawa'sche der menschlichen Peripherienerven.

Der Alkoholextrakt wurde im Wasserbad abgedampft und mit Äther, Aceton und Alkohol fraktionierend extrahiert, wie folgende Tabelle zeigt.



Die Löslichkeit der Substanzen der einzelnen Fraktionen, welche in der Tabelle nummeriert sind, in Äther, Alkohol und Aceton wird in folgender Tabelle gezeigt.

Man stellte beim menschlichen Nervenextrakt fast die gleichen Fraktionen fest.

Die Menge der gewonnenen Substanz war ausser den Fraktionen 2,3 und 5 so gering, dass die aus 6 g Nerven erhaltene nicht aus-

	Löslichkeit			zu vermutende Substanz
	Äther	Alkohol	Aceton	
1	+	—	—	Kephalin
2	+	+	—	Lecithin
3	+	+	+	Sterin
4	+	—	+	Fettsäure u. Neutralfett
5	—	+	—	Protagon
6	—	+	+	Glycoside

reichte zum Gebrauch zur Fällungsreaktion. Daher nahm ich die Fraktionen 2,3 und 5, weil sie von verhältnissmässig grosser Menge gewonnen wurde, mischte diese mit Lecithin, stellte folgende Reagenzien her und untersuchte die Reaktion im Serum.

Reagenzien: Bei allen folgenden mischte man 5 ccm 1% alkoholische Lecithinlösung mit 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung und fügte dazu je 15 ccm alkoholische Lösung der Fraktion 3 (Reagenz 1), der Fraktion 5 (Reagenz 2) der Fraktion 2 (Reagenz 3) und alkoholisches Nervenextrakt nach Kubokawa (Reagenz 4) bei. Die Herstellung der Reagenzien geschah, ausser durch Einschlebung meiner Tropfmethode (siehe oben), ganz nach Kubokawa. Die Reagenzien wurden einen Tag nach der Herstellung gebraucht. (1) zeigte nach 7 bis 10 Tagen eine grosse Menge weissen Niederschlag, (2) und (4) nach 10 Tagen nur eine geringe und (3) nach 7 Tagen eine grosse Menge weissen und gelben Niederschlag. Das Resultat der Fällungsreaktion war wie Tabelle XII zeigt:

TABELLE XII.

Serum \ Reagenz		(1)	(2)	(3)	(4)
Lepra	M.M.	+	+++	+++	+++
	N.Y.	+	+++	++	++
	I.M.	—	++	—	—
	K.S.	+	+	++	++
Gesunde	A.M.	++	+	—	—
	Y.S.	++	—	—	—

Der Tabelle nach zeigen die Reagenzien 1) und 2) auch im Gesunden-Serum ein positives Resultat, 3) und 4) zeigen ein gleiches Ergebnis. Bei diesen Experimenten konnte man also nicht erkennen, welche Fraktion die wichtigste in Bezug auf die Reaktion ist.

Demnächst machte ich einen alkoholischen Extrakt der Peripherienerven des Kaninchens im Verhältnis von 1 g Nerven-Material: 30 cem Alkohol nach Kubokawa'sche Methode, und schied von je 20 cem Extrakt 1) die in Aceton unlöslichen, 2) die unverseifbaren und 3) die in Äther unlöslichen Substanzen; die gewonnenen Mengen waren: 1) 0,017 g, 2) 0,0574 g und 3) 0,0136 g.

Diese Substanzen wurde zu je 0,1% Alkohollösung verarbeitet, Sankyo-Lecithin beigemischt und folgende Reagenzien hergestellt.

Reagenzien:

1) 0,1% alkohol. Lösg d. unverseifbar. Subst.	9,4 cem
1% alkohol. Sankyo-Lecithin-Lösg.	1,7 cem
physiologische Kochsalz-Lösg.	8,0 cem
2) 0,1% alkohol. Lösg d. in Aceton unlösl. Subst.	10,0 cem
1% alkohol. Sankyo-Lecithin-Lösg.	4,0 cem
physiologische Kochsalz-Lösg.	25,0 cem
3) 0,1% alkohol. Lösg d. in Äther unlösl. Subst.	7,0 cem
1% alkohol. Sankyo-Lecithin-Lösg.	2,5 cem
physiologische Kochsalz-Lösg.	15,0 cem
4) 1% alkoholische Sankyo-Lecithin-Lösg.	5,0 cem
Nervenextrakt	10,0 cem
physiologische Kochsalzlösg.	30,0 cem

Das Verhältnis der Quantität der aus den Nerven fraktionierten Substanzen in den Reagenzien 1), 2), und 3) zur Lecithinlösung entspricht einem Verhältnis der Menge einer aus 10 cem Nervenextrakt (nach Kubokawa extrahiert) fraktionierten Substanz zur 5 cem Lecithin-Lösung. Die alkoholische Lösung der Lipoidmischung wurde vor der Beimischung zur Kochsalz-Lösung auf 1,3 Volumen konzentriert, dementsprechend wurde die Menge der physiologischen Kochsalzlösung bemessen.

TABELLE XIII.

Serum	Reagenz	(1)	(2)	(3)	(4)
Lepra •	M.M.	+++	++	+++	+++
	N.Y.	++	++	++	++
	O.W.	-	-	±	-
	T.S.	+++	+++	++	+++
Gesunde	N.M.	-	-	-	-
	A.S.	-	-	-	-
	V.T.	-	-	±	-

Was das Resultat dieser Reagenzien auf die Fällungsreaktion betrifft, so ist dies bei Reagenz 1) und bei der aus Lecithin und Nervenextrakt (4) dasselbe, 2) zeigt eine schwache Reaktion, doch ist seine Positivität und Spezifität nicht anders als bei 4). Die Positivität und der Reaktionszustand von 3) auf das Lepraserum weicht kaum von dem von 4) ab, doch resultiert er bei einem Fall von Gesunderserum \pm , daher wird die Spezifität bezweifelt.

Aus diesen Experimenten muss man schliessen, dass die Substanz im Nervenextrakt, welche mit Sankyo-Lecithin auf die Reaktion eine Rolle spielt, die im Nervenextrakt enthaltene, unverseifbare Substanz sein müsse.

b. *Quantitative Analyse des Nervenextraktes.*

Man wird annehmen können, dass die oben beschriebenen vom Nervenextrakt getrennten 3 Substanzen, nämlich unverseifbaren (1), in Äther unlöslichen (2) und in Aceton unlöslichen (3), das unreine Cholesterin, das unreine Protagon und die unreinen Phosphatide sind; ich habe daher die quantitative Analyse des im alkoholischen Nervenextrakt enthaltenen Cholesterins, der Phosphatide und des Protagens aufgestellt.

Cholesterin:

Freies Cholesterin: 10 ccm alkoholischer Peripherienervenextrakt des Kaninchens (1 g: 30 ccm) wurden im Wasserbad vom Alkohol befreit, dem Rückstand Aceton beigemischt, filtriert, das

Filtrat konzentriert; diesem Rückstand wieder Aceton beigegeben, filtriert und das Filtrat konzentriert. Dieser Prozess wurde fünfmal wiederholt; dann wurde der in Aceton unlösliche Teil vollständig entfernt und der letzten Acetonlösung 1% alkoholische Digitonin Lösung beigelegt, erwärmt, verkorkt und gekühlt. Der auf diese Weise entstandene Niederschlag wurde am nächsten Tag in einem Jenaglasfilter gesammelt, je viermal mit Alkohol und Aceton und zum Schluss noch dreimal mit Alkohol gewaschen. Dann wurde er eine Stunde in einen Trockenschrank bei 100°–110° gestellt und hierauf eine Stunde im Exsiccator im Vacuum gekühlt. Danach wurde die Menge gewogen; sie betrug vom Digitonin-Cholesterid 0,0024 g, in Cholesterin umgerechnet, ist $0,0024/2,431 = 0,000987$ g, d. h. in 10 ccm alkoholischem Nervenextrakt ist 0,987 mg (ca. 0,01%) freies Cholesterin enthalten.

Gesamtcholesterin: 10 ccm Nervenextrakt wurden verseift, im Wasserbad bis zum Trocknen verdampft, Äther beigegeben, der in Äther lösliche Teil weggenommen, Äther entfernt, dem Rückstand Aceton beigelegt und der Acetonlösung 1% alkoholische Digitonins Lösung beigegeben. Das entstandene Digitonincholesterid wurde gewogen; die Menge betrug 0,0056 g, die Cholesterinmenge war $0,0056/2,431 = 0,0023$ g, d. h. in 10 ccm alkoholischem Nervenextrakt war 2,3 mg (0,023%) Gesamtcholesterin enthalten.

Phosphatide:

Man nahm 10 ccm Nervenextrakt und konzentrierte es. Vom Rückstand trennte man die in Äther löslichen Substanzen, konzentrierte diese, versachte den Rückstand nach Neumann'scher Methode und machte alles zu einer wässrigen Lösung. Daraus stellte man nach Embden(1921) phosphormolybdensaures Strichnin her, liess dies trocknen, wog es und stellte die Phosphormenge fest. Die Menge des ersteren betrug 0,0034 g, die des letzteren war $0,0034/89,32 = 0,0038$ mg; dies entspricht 0,00038% des Bestimmungsmaterials. Wenn man annimmt, dass die Phosphormenge ganz vom Lecithin kommt und das Lecithin für Distearyllecithin ansieht, kommt die Lecithinmenge auf etwa 0,873 mg (0,0087%), was allerdings sehr wenig wäre.

Protagon:

10 ccm Nervenextrakt wurden konzentriert, getrocknet, der Rückstand mit Äther extrahiert und die noch zurückbleibenden, in Äther unlöslichen Substanzen je sechsmal mit Äther, Chloroform und kaltem Aceton gewaschen und getrocknet. Die gewogene Menge betrug 0,0031 g. Die Substanz ist weiss und körnig, lässt sich leicht pulverisieren und ist in Aceton, Chloroform und Äther nicht, doch in warmem Alkohol und warmem Pyridin leicht löslich. Diese Lösungen schieden beim Erkalten in Zimmertemperatur einen weissen, körnigen Niederschlag aus. Nach diesen Eigenschaften wird diese Substanz das Protagon sein. Diese Substanz ist ganz gleich der, die entsteht, wenn man bei der Herstellung des Kubokawa'schen Reagens den alkoholischen Nervenextrakt in 56° in Zimmertemperatur stehen lässt.

*B. Analyse des Sankyo-Lecithins.**a. Fraktionierung.*

Man konnte bei den vorhergehenden Experimenten feststellen, dass das verhältnismässig reine Lecithin die Fällungsreaktion auf Lepraserum bis zu einem gewissen Grad hervorrufen kann, doch war diese Reaktion nicht so stark wie durch Sankyo-Lecithin. Um festzustellen, welcher Unterschied zwischen dem Sankyo-Lecithin und dem reinen Lecithin ist, und was die Stärke der Reaktion schwanken lässt, wurde die Analyse des Sankyo-Lecithins ausgeführt.

Sankyo-Lecithin (Darstellungsnummer 2172 YNM) konnte ich in folgende sechs Fraktionen teilen:

- (1) In einen in Äther unlöslichen,
- (2) einen in reinem Alkohol und Aceton unlöslichen,
- (3) einen in Aceton löslichen,
- (4) einen unverseifbaren,
- (5) einen in Aceton unlöslichen, aber in Äther löslichen,
- (6) einen in Aceton unlöslichen, in Reinalkohol und Äther löslichen Teil.

Diese Substanzen wurden verschieden gemischt, folgende 13

Reagenzien hergestellt und deren Fällungsreaktion für das Lepraserum untersucht:

Reagenzien werden in folgender Tabelle gezeigt: Von jeder Fraktion wurde nach der Löslichkeit zum Lösungsmittel die Alkohol-, Aceton oder Äther-Lösung gemacht und jede zu 30 ccm physiologischer Kochsalzlösung zugefügt.

- 1 (5 ccm Fr. 5)
- 2 („ „ 2)
- 3 („ „ 1)
- 4 („ „ 3)
- 5 („ „ 6)
- 6 („ „ 6) + (1 ccm Fr. 4)
- 7 („ „ 6) + („ „ 3)
- 8 (1 ccm „ 6) + (5 „ 1)
- 9 (5 „ 6) + („ „ 2)
- 10 („ „ 6) + (1 „ 4) + (1 ccm Fr. 3)
- 11 („ „ 6) + („ „ 4) + („ „ 3) + (1 ccm Fr. 1)
- 12 („ „ 6) + („ „ 4) + („ „ 3) + („ „)
+ (1 ccm Fr. 2)
- 13 („ Sankyo-Lecithin) + (Nervenextrakt)

Die Resultate der Fällungsreaktion sind folgende:

Die Reaktion war durch das Reagenz (1), welches aus der in Aceton unlöslichen, in Äther löslichen Fraktion von Sankyo-Lecithin besteht, etwas schwächer als durch das Reagenz (13), welches nach Kubokawa'sches Methode aus Sankyo-Lecithin selbst hergestellt wurde. Doch kann man sie fast als gleich bezeichnen. Das aus Kephalin, welches in Sankyo-Lecithin enthalten ist, gemachte Reagenz (2) zeigte einen stärkeren Reaktionszustand als 13), doch kamen beim Gesundenserum auch Fälle vor, wo man weder positiv noch negativ feststellen konnte. Die Reagenzien 3), 11) und 12) reagierten an beiden, gesunden und leprösen Seren negativ. Bei 4) war es schwer, eine spezifische Reaktion festzustellen; bei 5) war der Reaktionsgrad schwach, jedoch war es spezifisch für das Lepraserum. Das Reagenz 6), d. h. die Mischung von reinem Lecithin und unverseifbarer Substanz, beide aus

TABELLE XIV.

Reagenz	Serum		Lepra			Gesunde		die in jeden Reagenzien zu enthaltende Substanzen
	T.K.	O.Y.	I.M.	Gesunde				
				A.U.	I.S.			
1	+++	+	-	-	-	Phosphatide		
2	++++	++	-	-	±	Kephalin		
3	-	-	-	-	-	Protagon		
4	±	+	-	-	±	Acetonlösl. Subst.		
5	+	+	-	-	-	Lecithin		
6	+	-	-	-	-	" + unverseifb. Subst.		
7	+	-	-	-	-	" + acetonlösl. Subst.		
8	+	-	-	-	-	" + Protagon		
9	++++	++++	-	-	++	" + Kephalin		
10	+	-	-	-	-	" + unverseifb. Subst. + Acetonlösl. Subst.		
11	-	-	-	-	-	" + unverseifb. Subst. + Acetonlösl. Subst. + Ätherunlösl. Subst.		
12	-	-	-	-	-	" + unverseifb. Subst. + Acetonlösl. Subst. + Ätherunlösl. Subst. + Kephalin		
13	++++	+	-	-	-	" + Nerven-Ext.		

Sankyo-Lecithin geschieden, zeigte keine hohe Positivität; der Reaktionszustand war schwach, auf das Gesunden-Serum war dieses Reagenz jedoch negativ. 7) und 8) zeigten dasselbe Verhalten wie die vorigen. Das Reagenz 9) auf das Lepraserum war sehr stark positiv, auf das Gesundenserum schwach positiv oder mittelmässig positiv, ähnlich wie 2). Es ist interessant anzunehmen, dass die Eigenschaft, welche durch das Reagenz 9) und 2) gezeigt wurde, durch das Kephalin hervorgerufen sein dürfte. Bei 10) war wie bei 6), 7) und 8) die Positivität und Reaktionsstärke niedrig.

Aus den Resultaten wurde zusammengefasst: Die Reagenzien, die vollständig negativ reagierten, sind 3), 11) und 12); die auf das Lepraserum schwach positiv, auf das Gesundenserum negativ reagierten waren, 5), 6), 7), 8) und 10); auf beide Seren in gleicher Weise positiv war 4); 2) und 9) waren am stärksten positiv auf das Lepraserum und auf das Gesundenserum \pm . Gleich wie das Kubokawa'sche Reagenz war 1).

b. Quantitative Analyse.

Als nächstes wurde der Gehalt des im Sankyo-Lecithin enthaltenen Cholesterins, Lecithins, Kephalsins und Protagens bestimmt.

Cholesterin:

5 cem 1% alkoholische Sankyo-Lecithin-Lösung wurde verseift und mit Äther extrahiert, der Rückstand in Aceton-Lösung gebracht und 1% alkoholische Digitonin-Lösung beigegeben. Das erhaltene Digitonincholesterid 0,0024 g, und die Cholesterinmenge war $0,0024 \cdot 2,431 = 0,00987$ g. Auf dieselbe Weise wurde die Menge noch zweimal bestimmt; die Resultate waren 0,000952 g und 0,0010696 g, der Durchschnitt dieser drei Resultate 0,001003 g, diesem Resultat nach kann man sagen, dass in 0,05 g Sankyo-Lecithin 0,001003 g (2,00%) Cholesterin enthalten ist.

Phosphatide:

5 cem 1% alkoholische Sankyo-Lecithin-Lösung wurde versäht und nach Embden's Methode die Phosphormenge bestimmt; Die

Menge der phosphormolybdensäure-Strichninfällung betrug 0,1658 g. Dies, in Phosphor umgerechnet, ergab $0,1658/89,32 = 0,001856$ g, was 3,712% entspricht.

Um danach die im Sankyo-Lecithin enthaltene Kephalinmenge zu bestimmen, wurden zu 3,0 g Sankyo-Lecithin 30 ccm reiner Alkohol zugegeben und vorgekommene Teilchen wurden, nachdem sie 1–2 Stunden in Zimmertemperatur ruhig stehen gelassen wurden, in einem Jenaglasfilter filtriert, fünfmal mit reinem Alkohol gewaschen und getrocknet. Die Menge der Fällung war 0,202 g. Das Filtrat wurde mit der Waschflüssigkeit vereinigt, 24 Stunden in eine Eiskammer von 0° gestellt, worauf eine gelblich-weiße Fällung entstand. Diese wurde behandelt, wie oben beschrieben, und gewogen; die Menge betrug 0,173 g. Weiter wurde das Filtrat im Vacuum verdampft, Alkohol entfernt und getrocknet, dann wieder von neuem 30 ccm reiner Alkohol zugefügt und das Ganze 48 Stunden in der Eiskammer von 0°–2° ruhig stehen gelassen, worauf eine gelblichweiße Fällung entstand, deren Gewicht 0,061 g betrug. Die Gesamtmenge der durch dieses Verfahren erhaltenen Substanz war 0,436 g und auf 3,0 g Sankyo-Lecithin kam 14,45% Fällung. Da man jedoch annehmen kann, dass der Fällung Lecithin oder als dessen Abbauprodukt geltende Fettsäure beigemischt ist oder dass sich das Kephalin im Filtrat auflöst, kann man diese Fällungsmenge nicht geradezu als Kephalinmenge bezeichnen.

Hierauf bestimmte ich nach Kjeldahl's Methode den Stickstoff in 1 g Sankyo-Lecithin. Das Volumen der durch Ammoniak neutralisierten $n/10$ H_2SO_4 -Lösung war 11,9 ccm, die Stickstoffmenge war 16,672 mg, demgemäss ist die Gesamtstickstoffmenge von 5 ccm 1% alkoholischer Sankyo-Lecithinlösung 0,8336 mg. Darauf wurde 1 ccm 5,0% wässrige Sankyo-Lecithin-Lösung genommen und nach Van Slyke Amino-Stickstoff bestimmt. Der durchschnittliche Wert dreimaliger Bestimmung war 0,715 ccm, den durchschnittlichen Wert von 0,205 ccm der fünfmaligen Volumbestimmung der Leerversuche davon abgezogen, ergab 0,51 ccm, d. h. 0,296565 mg (bei 763 mm Hg., 16°), d. h., diese Menge entspricht der des Aminostickstoffs von 5 ccm 1% alkoholischer Sankyo-

Lecithinlösung. Die Proportion des Gesamt- und Aminostickstoffes war $\text{NH}_2\text{-Stickstoff/Gesamtstickstoff} = 0,2965/0,8336 = 36/100$.

Protagon:

5 g Sankyo-Lecithin wurden in 5 ccm reinem Äther aufgelöst, verkorkt, 48 Stunden in der Eiskammer von 0° stehen gelassen und es entstand eine weisse, feinkörnige Fällung. Diese wurde in einen Jenaglasfilter getan, mit eisgekühltem Wasser gewaschen, die Waschflüssigkeit und das Filtrat zusammen konzentriert, dem Rückstand von neuem reiner Äther hinzugefügt und dies ruhig in der Eiskammer stehen gelassen. Die entstandene Fällung wurde wieder in einen Jenaglasfilter gegeben und mit eisgekühltem Äther gewaschen. Dieses Verfahren wurde viermal wiederholt, die erhaltene Fällung wurde in einen Jenaglasfilter gebracht, je dreimal mit Äther und Chloroform und fünfmal mit Aceton gewaschen, getrocknet; das Gewicht betrug 0,0048 g. Diese Substanz ist leicht und pulverig, in Äther, Chloroform und Aceton unlöslich, in warmem Alkohol und Pyridin aber löslich.

Die in 30 ccm Kubokawa'schen Reagenzes enthaltenen Lipoidarten, die Resultate der Bestimmungen zusammenfasst, wird in folgender Tabelle gezeigt.

TABELLE XV.

Kubokawa'sches Reagenz	Lecithin	Kephalin	Gesamt Cholesterin	Protagon
1% Sankyo-Lecithin 5 ccm	30,54 mg	15,8 mg	1,003 mg	0,048 mg
Nerven-Extrakt 10 ccm	0,87 mg	?	2,300 mg	3,100 mg
Summe	31,41 mg	15,8 mg	3,303 mg	3,148 mg

Jede Substanz in der Tabelle wurde wie folgt errechnet. Die Menge des Lecithins wurde von der Differenz der Gesamtstickstoffmenge und Aminostickstoffmenge (also $0,8336 - 0,2965 = 0,5371$ mg) und die des Kephalins von Aminostickstoffmenge und zwar das Lecithin und Kephalin als Distearyllecithin (Molekulargewicht ca. 795) und Distearylkephalin (Molekulargewicht ca. 747) berechnet. Da im Nervenextrakt nur sehr wenig Phosphatide enthalten

sind, trennte ich nicht das Kephalin und Lecithin, sondern berechnete aus der Phosphormenge das Distearyllecithin.

Der Aufstellung nach kommt auf 1000 cem Kubokawa'schen Reagenzes etwa folgender Gehalt der Lipoiden:

Lecithin 1,0 g, Kephalin 0,5 g, Cholesterin 0,1 g, Protagon 0,1 g.

VI. ZUSAMMENGESetzte REAGENZIEN.

Aus den bisherigen Experimenten haben wir die hauptsächlichsten Bestandteile der Reagenzien, deren Gehalt und Rolle ziemlich gut kennen gelernt und wollen nun die einzelnen Bestandteile mischen, die zusammengesetzten Reagenzien herstellen und deren Antigenität untersuchen.

A. Die Darstellung einzelner Lipoide.

Da, wie oben schon gesagt, die hauptsächlichsten Bestandteile der Reagenzien Lecithin, Kephalin, Cholesterin und Protagon sind, stellte ich diese Substanzen aus dem Eigelb oder dem Rinderhirn her.

Lecithin:

Aus 136 g Eigelb wurde nach Sueyoshi's Methode (1931) Lecithin hergestellt und zum Schluss 3 g weisses klumpiges Lecithin erhalten.

Aminostickstoff (Van Slyke's Methode): 0,3 g Lecithin entwickelte Stickstoffgas 0,37 cem (bei 758 mm Hg, 16°), also $\text{NH}_2\text{-N}$ 0,21983 mg. Stickstoff (Kjeldahl): 0,3 g Lecithin forderte für Neutralisierung 3,8 cem 0,1 n H_2SO_4 , also $\text{N} = 1,401 \times 3,8 = 5,3238$ mg. Daher war $\text{NH}_2\text{-N}/\text{Gesamt-N} = 4,1/100$.

Kephalin:

Nachdem man aus den während der Lecithinbereitung entstandenen, in Alkohol unlöslichen Substanzen den Alkohol entfernt hatte, löste man diese in Äther auf, konzentrierte sie sirupähnlich, gab sie dann tropfenweise in reinen Alkohol, nahm die erhaltene Fällung und wiederholte das Verfahren sechsmal. Aus der dann entstandenen Fällung entfernte man den Alkohol, löste sie in Petrol-Äther auf und konzentrierte sie; die sirupöse Flüssigkeit

brachte man tropfenweise in reinen Alkohol und fällte sie. Mit der Fällung wiederholte man fünfmal dieses Verfahren und die zuletzt erhaltene brachte man in einen Mörser, gab warmes Aceton dazu, vermengte alles, dekaptierte das Aceton und wiederholte dies Verfahren sechsmal. Hierauf entfernte man das Aceton, löste es in Äther auf und konzentrierte es sirupös. Dann brachte man es tropfenweise in eine Mischung von 10 Volumen mit destilliertem Wasser gesättigtem Äther und 90 Volumen reinem Alkohol. Das Verfahren wiederholte man fünfmal und hierauf wiederum fünfmal die Waschung mit heissem Aceton und stellte den Extrakt zum Trocknen. 0,1 g auf diese Weise erhaltenes Kephalin machte man zu 10 cem wässriger Emulsion. Aminostickstoff (Van Slyke): 3 cem Lösung gab 1,02 cem = 0,5895 mg (1,9652%) Stickstoff bei 16°C und 758 mm. Hg. Gesamtstickstoff (Kjeldahl): 5 cem Material forderte zur Neutralisierung 7,387 cem 0,01 n H_2SO_4 (Durchschnitt dreimaliger Versuche), also $N = 7,387 \times 0,1401 = 1,0349$ mg (2,0698%). Daher $\text{NH}_2\text{N}/\text{Gesamt.-N} = 95/100$.

Ausserdem habe ich aus Rinderhirn auf dieselbe Weise Kephalin hergestellt.

Cholesterin:

Die in Aceton löslichen Substanzen aus zwei Rinderhirnen wurden von Aceton befreit und der Rückstand mit 20% Natronlauge verseift, verdampft, getrocknet und mit Äther extrahiert; der vom Äther freie Rückstand wurde zum zweitenmal verseift, mit Äther extrahiert, der Extrakt verdampft und der Rückstand in warmem Alkohol aufgelöst. Das durch Erkalten ausgeschiedene wurde darauf viermal mit sauer weisser Tonerde und siebenmal mit Tierkohle entfärbt und mit reinem Alkohol fünfmal rekristallisiert; das erhaltene Cholesterin betrug 3,5 g. Es wurde in 100-110° zwei Stunden lang erhitzt, löste sich in wasserfreiem Äther auf, filtriert, entfernte man Äther aus dem Filtrat. Das erhaltene Kristall war nadelförmig, dessen Schmelzpunkt 147,5°.

Protagon:

Man nahm vom Rinderhirn den Satz der in Äther und Aceton

löslichen Substanzen, extrahierte diesen viermal mit Äther und dreimal mit Aceton und nachdem man die in Aceton und Äther löslichen Substanzen möglichst entfernt hatte, wusch man fünfmal mit Wasser, zweimal mit Aceton und einmal mit Äther, erwärmte auf 40–50°, entfernte den Äther, gab reinen Alkohol dazu und extrahierte drei Stunden lang im Wasserbad mit Rückflusskühler, filtrierte schnell diesen Extrakt, liess erkalten und erhielt eine weisse, körnige Fällung. Diese filtrierte man und brachte das auf Filtrierpapier, gab neuen warmen Alkohol dazu, filtrierte, liess das Filtrat erkalten und fällen. Dieses Verfahren wiederholte man fünfmal, dann wusch man dreimal mit Chloroform und dreimal mit Äther. Nachdem man das Ganze mit Pyridin fünfmal hatte rekristallisieren lassen, wusch man es noch dreimal mit Äther, trocknete es und erhielt ein weisses, leichtes Pulver.

Dieses löste sich nicht in Äther, Chloroform und Aceton, aber in warmem Alkohol oder warmem Pyridin leicht und ergibt beim Erkalten eine Fällung.

B. Alleiniger Gebrauch einzelner Lipide.

Ich wollte nun die Stellung des auf oben beschriebene Weise hergestellten Lecithin, Kephalin, Cholesterin und Protagons, die einzeln allein als Reagenzien gebraucht wurden, zur Fällungsreaktion feststellen.

Lecithin:

Durch Mischung von 2, 3, 5, 7, 9 und 12 ccm 1% alkoholischer Lecithinlösung mit je 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung wurde eine kolloidale Lösung hergestellt, die als Reagenz gebraucht und deren Stellung zur Fällungsreaktion im Lepraserum untersucht wurde.

Wie man aus der Tabelle ersieht, zeigen alle Reagenzien eine deutliche Fällungsreaktion und ihre Stärke vermehrte sich proportional der Konzentration, doch konnte man nicht feststellen, dass bei einer stärkeren Konzentration als "5" die Fällungsreaktion besonders stark war.

TABELLE XVI.

Serum	Reagenz	Die Menge 1% Lecithinlsg. (cem) in 20 cem physiol. Kochsalzlsg.						Sankyo-Lecithin + Nervenextrakt
		2	3	5	7	9	12	
Lepra	M.M.	—	—	—	—	—	—	—
	D.I.	—	—	—	—	—	—	—
	M.N.	—	—	—	—	—	—	—
	G.H.	+	++	+++	++	+++	+++	+++
	U.M.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Gesunde	I.S.	—	—	—	—	—	—	—
	K.T.	—	—	—	—	—	—	—

Kephalin:

1, 2, 3, 4 und 5 cem 1% Kephalin-Äther-Lösung wurden in je 20 cem physiologischer Kochsalzlösung getan und eine kolloidale Lösung hergestellt, die man als Reagenz gebrauchte und deren Stellung zur Fällungsreaktion im Lepraserum untersuchte.

Bei der Herstellung des Reagenz war es schwer, mehr als 6 cem 1% Kephalin-Äther-Lösung in der 20 cem Kochsalzlösung homogen zu emulgieren.

TABELLE XVII.

Serum	Reagenz	Die Menge 1% Kephalin-Ätherlsg. (cem) in 20 cem physiolog. Kochsalzlsg.				
		1	2	3	4	5
Lepra	U.M.	+++	+++	+++	+++	+++
	G.H.	+++	+++	+++	+++	+++
	K.Y.	++	+++	+++	+++	+++
	Y.N.	—	—	+	+	+
	O.N.	—	—	+	+	++
Gesunde	I.S.	—	—	—	+	++
	K.T.	—	—	—	+	++

Wie die Tabelle zeigt, zeigt das Kephalin eine sehr starke Reaktion; die der 1/20 bewirkt es so stark positiv wie 5/20 Lecithin.

und die Konzentrationen über $4/20$ waren auch auf das Gesunderserum positiv.

Danach verdünnte man die Konzentration des Kephaling, indem man die Proportion der physiologischen Kochsalzlösung und der 1% ätherischen Kephaling-Lösung auf $2/20$, $1/20$, $1/30$, $1/40$, $1/80$ und $1/160$ brachte; ferner nahm man zur Kontrolle $5/20$ von Lecithin, und verglich den Zustand der Fällungsreaktion.

TABELLE XVIII.

Reagenz		Kephaling						Lecithin $5/20$
Serum		$2/20$	$1/20$	$1/30$	$1/40$	$1/80$	$1/160$	
Lepra	G.H.	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
	T.M.	+++	+++	+++	+++	++	++	+++
	G.Y.	++	++	+	±	—	—	++
	Y.N.	—	±	—	—	—	—	—
	O.N.	—	—	—	—	—	—	—
Gesunde	N.M.	—	±	—	—	—	—	—
	S.Y.	—	—	—	—	—	—	—
	T.M.	—	—	—	—	—	—	—
	K.U.	—	—	—	—	—	—	—

Bei diesem Versuch ruft $1/20$ Kephaling-Lösung dieselbe Reaktionsstärke hervor wie $5/20$ Lecithin-Lösung, es kommt beim Gesunderserum auch ein Fall \pm vor. Die $1/30$ Kephaling-Lösung ruft beinahe dieselbe Reaktionsstärke hervor, wie die $5/20$ Lecithin-Lösung, und bei allen Gesunderseren nur negative Reaktion, sogar bei der $1/160$ Kephaling-Lösung konnte man eine mittelmässig positive Reaktion des Lepra-Serums sehen.

Wenn man die kolloidale Kephaling-Lösung längere Zeit (5 Tage) stehen lässt, wird die Lösung labil, und wenn man die $1/20$ – $1/40$ Lösung dem Gesunderserum beigibt und vier Stunden in einem Brutofen bei 37° stehen lässt, kommt es vor, dass sich eine Fällung bildet.

Hierauf stellte man aus dem Rinderhirn einerseits nach Levene und Rolf (1919) und andererseits nach Parnas (1909)

das Kephalin her. Beim ersteren war Gesamt-N:NH₂-N—100:95, beim letzteren war 100:89. Aus diesem Kephalin stellte man das Reagenz her und untersuchte die Fällungsreaktion des Lepra-serums.

TABELLE XIX.

Serum	Reagenz	Kephalin	
		nach Parnas hergestellt	nach Levene hergestellt
Lepra	C.K.	+++	+++
	M.K.	—	—
	I.K.	—	—
	O.N.	+++	+++
	N.M.	+	+
	T.R.	++	++
	T.K.	—	—
	T.S.	—	—
	O.S.	+++	+++
	M.E.	++	++
Gesunde	I.S.	—	—
	T.S.	—	—
	R.D.	—	—
	K.T.	—	—
	I.H.	—	—

Es zeigte sich kein Unterschied zwischen diesen beiden Kephalinen.

Cholesterin:

Je 6,5 cem 0,1% alkoholische Cholesterin-Lösung wurde in 30, 60, 120, 240 und 480 cem physiologischer Kochsalzlösung tropfenweise gegeben und die so gefertigte kolloidale Lösung zum Reagenz gemacht, mit dem die Fällungsreaktion auf das Lepra-serum untersucht wurde. Die Resultate werden in Tabelle XX gezeigt.

Ausser der Lösung von 6,5/120, die auf beide Seren negativ war, zeigten alle anderen sowohl auf das Lepra- wie auch auf das Gesundenserum denselben Reaktionszustand. Beim Gebrauch des

TABELLE XX.

Reagenz		6,5/30	6,5/60	6,5/120	6,5/240	6,5/480
Serum						
Lepra	Y.N.	+	—	—	+	++
	G.Y.	—	±	—	+	+
Gesunde	N.M.	±	±	—	—	+
	T.M.	±	±	—	±	±
	K.U.	++	—	—	—	±

Cholesterins allein konnte man also keine für das Lepraserum spezifische Reaktion feststellen. Wahrscheinlich hat es bei jedem Serum die Eigenschaft leicht zu fällen.

Protagon:

Je 13 cem 0,1% alkoholische Protagon-Lösung wurde zu 30, 60, 120 und 240 cem physiologischer Kochsalzlösung gegeben und zum Reagenz verarbeitet. Das Resultat der Reaktion wird in der folgenden Tabelle gezeigt.

TABELLE XXI.

Reagenz		13/30	13/60	13/120	13/240
Serum					
Lepra	Y.N.	±	+	+	+
	K.Y.	±	±	+	+
Gesunde	N.M.	+	+	+	+
	T.M.	+	±	+	++

Auch hier zeigte sich keine spezifische Reaktion und dass, wie die Tabelle zeigt, bei verdünnter Konzentration der Fällungsgrad höher ist, kommt wohl daher, dass der in dem Reagenz enthaltene Alkohol darauf Einfluss ausübt.

C. Über die Reagenzien aus verschiedenen zusammengemischten Lipoiden.

Aus den Versuchen des vorigen Abschnittes ersieht man, dass

die Reaktion des Lepraserums am stärksten vom Kephalin und am geringsten vom Lecithin beeinflusst wird, und dass das Cholesterin und Protagon keine spezifische Reaktion hervorruft. Daher hat man dem Kephalin und Lecithin andere Substanzen beigemischt, verschiedene Reagenzien hergestellt und untersucht, welche Substanz und mit welchen Proportionen das brauchbarste Reagenz für die Reaktion herstellt.

Lecithin und Cholesterin:

1% alkoholische Lecithin-Lösung und 0,1% alkoholische Cholesterin-Lösung wurden zu folgenden Proportionen gemischt und auf 3 ccm konzentriert. Jede Mischung wurde tropfenweise in je 15 ccm physiologische Kochsalzlösung gebracht, bei jedem gut geschüttelt und zum Reagenz verarbeitet.

Reagenzien:	Lecithin-Lösung (cem)	Cholesterin-Lösung (cem)
1)	2,5	15
2)	„	10
3)	„	8
4)	„	6
5)	„	4
6)	„	3
7)	„	2
8)	„	1
9)	als Kontrolle das Kubokawa'sche Reagenz.	

Die mit diesen Reagenzien erzeugte Reaktion der Seren wird auf der folgenden Tabelle gezeigt:

TABELLE XXII.

[illegible]

Die Reaktionen dieser Reagenzien auf das Serum werden in Tabelle XXIII gezeigt. Bei 3), 4), und 5) ist die Positivität am höchsten und sie zeigen eine spezifische Reaktion auf das Lepra-serum, bei 1) und 2) war sie schwach und 6), 7) und 8) hatten sie ihre Spezifität verloren.

Lecithin und Protagon:

10 cem von 0,03% alkoholischer Protagon-Lösung wurden mit je 5 cem 1% alkoholischer Lecithin-Lösung vermischt, auf 5 cem konzentriert und tropfenweise in 30 cem physiologischer Kochsalzlösung gegeben, und mit diesem Reagenz wurde die Reaktion geprüft.

TABELLE XXIV.

Serum	Reagenz	Lecithin +		Sankyo-Lecithin + Nervenextrakt
		0,03% Protagon	0,1% Protagon	
Lepra	S.K.	—	—	—
	M.M.	+++	±	++
	I.M.	—	—	—
Gesunde	I.S.	—	—	—
	Y.S.	—	—	—
	A.U.	—	—	—

Bei diesen Versuchen war die Reaktion durch das Reagenz von 10 cem 0,03% alkoholischer Protagon-Lösung und 5 cem 1% Lecithin-Lösung, verglichen mit der durch Kubokawa's Reagenz, stärker und die durch 10 cem 0,1% alkoholische Protagon-Lösung und 5 cem Lecithin-Lösung schwächer.

Kephalin und Cholesterin oder Protagon:

Bei der Herstellung des Reagenz durch Mischung von ätherischer Kephalin-Lösung und anderer alkoholischer Lipoid-Lösungen brachte man zuerst die ätherische Kephalin-Lösung allein in die physiologische Kochsalzlösung, da das in der Ätherlösung enthaltene Kephalin durch Beimischung von Alkohol gefällt wird, dann fügte man der Mischung andere alkoholische Lipoidlösung hinzu, erwärmte die gemischte Lösung bei 56° und entfernte den Äther. Man nahm nun 3 Kombination: "5 cem 1% ätherische Kephalin-Lösung und 3 cem 0,1% alkoholische Cholesterinlösung, oder 3 cem 0,1% alkoholische Protagon-Lösung, oder 10 cem Peri-

pharienerven-Extrakt des Kaninchens'', und gab zu jedem je 30 ccm physiologische Kochsalzlösung bei und stellte auf oben beschriebene Weise ein Reagenz her. Als Kontrolle nahm man Kubokawa's Reagenz und stellte den Zustand der Serum-Reaktion fest.

TABELLE XXV.

Reagenz Serum		Kephalin +			Sankyo- Lecithin + Nervenextrakt
		Cholesterin	Protagon	Nervenextrakt	
Lepra	S.T.	±	++	++	—
	H.A.	—	±	+	—
	S.K.	+++	+++	+++	++
Gesunde	I.S.	±	±	±	—
	Y.S.	±	+	+	—
	A.U.	—	±	±	—

Aus der Tabelle ersieht man, dass das Reagenz aus Kephalin und Cholesterin eine unspezifische Reaktion aufweist; das kommt wohl daher, dass beim Gebrauch von Kephalin allein, also bei einer Proportion von über 3/20—4/20 des 1% Kephalins zur physiologischen Kochsalzlösung Unspezifität auftritt; und da bei diesen Versuchen die Proportion $5/30 = 3.3/20$ betrug, war die Konzentration des Kephalins viel zu hoch. Die Reagenzien aus Kephalin und Protagon oder ersterem und Nervenextrakt zeigen fast den gleichen Reaktionszustand. Von diesen drei Reagenzien zeigt die aus Kephalin und Nervenextrakt am deutlichsten die unspezifische Reaktion, dann kommt die aus Kephalin und Protagon und schliesslich die aus ersterem und Cholesterin.

Hierauf nahm man nur 2 ccm 1% Kephalin, mischte dieselbe Menge der anderen Lipoiden wie beim vorigen, stellte die Reagenzien her und untersuchte die Reaktionen. Das Resultat war folgendes:

Bei diesen Versuchen war nur das Reagenz aus Kephalin und Nervenextrakt unspezifisch, die anderen wiesen einen geringfügig stärkeren positiven Reaktionsgrad auf als das zur Kontrolle dienende Kubokawa'sche Reagenz.

TABELLE XXVI.

Serum	Reagenz	Kephalin 2 ccm +			Sankyo-Leci. + Nervenextr.
		Cholesterin 3 ccm	Protagon 3 ccm	Nervenextrakt 10 ccm	
Lepra	T.S.	±	±	±	—
	A.B.	—	—	—	—
	K.S.	+++	+++	+++	+++
Gesunde	I.S.	—	—	—	—
	Y.S.	—	—	±	—
	A.U.	—	—	—	—

Kephalin und Lecithin:

Die folgenden Volumen von je 1% ätherischen Lösung des Kephalins und des Lecithins brachte man zusammen, mischte 12 ccm physiologische Kochsalzlösung bei und stellte die Reagenzien her.

Reagenzien: 1% Lecithin-Lösung: 1% Kephalin-Lösung:

1)	1,0 ccm	1,0 ccm
2)	1,2	0,8
3)	1,4	0,6
4)	1,6	0,4
5)	1,8	0,2
6)	2,0	0,0
7)	0,0	2,0

8) als Kontrolle gebrauchte man das Kubokawa'sche Reagenz.

Mit diesen Reagenzien untersuchte man die Serum-Reaktion; die Resultate nach vierstündigen Ruhen in einem Brutofen bei 37° zeigt folgende Tabelle:

Der Tabelle nach, zeigen alle Reagenzien, mit Ausnahme des Reagenz von 2 ccm Kephalin (7), eine Spezifität auf das Lepra-serum und von diesen ist bei 1), 2), 3) und 4), also bei denen, die eine Proportion der Lecithin- und Kephalinmenge von 1:1 bis 1,6:0,4 haben, im Vergleich zur Kontrolle die Positivität und die Reaktionsträrke gross; am deutlichsten ist dies bei den Reagenzien 2), 3) und 4), also bei einer Proportion von 1,2:0,8 bis 1,6:0,4.

TABELLE XXVII.

Reagenz		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Serum		1:1	1,2:0,8	1,4:0,6	1,6:0,4	1,8:0,2	2,0:0,0	0,0:2,0	L. + N.E.
Lepra	K.S.	+++	+++	+++	+++	—	—	++	—
	M.M.	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++
	N.T.	—	+	+	+	—	—	±	—
	M.D.	+++	+++	+++	+++	+	—	+++	+++
	K.D.	+++	+++	+++	+	—	—	++	—
	O.S.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Gesunde	S.Y.	—	—	—	—	—	—	—	—
	T.S.	—	—	—	—	—	—	—	—
	K.U.	—	—	—	—	—	—	±	—
	Y.K.	—	—	—	—	—	—	—	—

Das Reagenz 5) mit einer Proportion von 1,8:0,2 ist ziemlich ähnlich der Kontrolle, während 6), also das nur aus Lecithin, auffallend schwächer ist. Das Reagenz 7), nur aus Kephalin, weist im Lepraserum eine hohe Positivität auf, doch ziegte sich auch eine geringe unspezifische Eigenschaft. Da die Proportion des Gesamtstickstoffes und Aminostickstoffes des gebrauchten Lecithins 100:4 und die des Kephalin 100:95 war, und wenn man annimmt, dass der Aminostickstoff aus dem Kephalin und der Unterschied der Gesamtstickstoff- und Aminostickstoffmenge aus dem Lecithin kommt, ist die Proportion des zu den Reagenzien gebrauchten Lecithins zum Kephalin folgende:

Lec. : Keph.

- 1) 50,5 : 49,5
- 2) 59,9 : 40,1
- 3) 68,7 : 31,3
- 4) 77,9 : 22,1
- 5) 87,4 : 12,6
- 6) 96,0 : 4,0

Es gibt kein Reagenz, das ganz frei von Lecithin oder Kephalin ist.

Wenn demnach als Abscisse die Proportion der Kephalin- und Lecithinmenge in den Reagenzien, und als Ordinate die Positivität

der Reagenzien d. h. die Positivzahlen (+) auf die 6 Seren aufgetragen wird, ergibt sich eine Kurve. Wenn man in der Kurve den Punkt für die Positivzahl der Reaktion durch Kubokawa-Reagens sucht und von diesem Punkt aus die Proportion des Kephaling und Lecithins berechnet, ergibt sich ca. 10–13.

Kephalin-Lecithin-Mischung und Cholesterin oder Protagon:

Da aus dem Experiment des vorigen Absatzes erkannt wurde, dass das Reagens mit Proportion von 7:3 von Lecithin und Kephalin am schärfsten reagierte, wurde dann dieser Mischung Cholesterin oder Protagon beigelegt und mit diesen Reagenzien die Serumreaktion untersucht.

1,4 ccm 1% alkoholische Lecithin-Lösung und 0,6 ccm 1% ätherische Kephalin-Lösung wurden mit 12 ccm physiologischer Kochsalzlösung vermischt und diese Lösung achtmal hergestellt; je einer fügte man 0,4, 0,8, 1,2 und 1,6 ccm 0,1% alkoholische Cholesterin-Lösung, den übrigen vier 0,4, 0,8, 1,2 und 1,6 ccm 0,1% alkoholische Protagon-Lösung bei. Mit diesen acht Arten erzielte man Resultate, die in Tabelle XXVIII gezeigt sind.

TABELLE XXVIII.

Reagenz		Kephalin + Lecithin							
		+ Cholesterin				+ Protagon			
		(1) 0,4	(2) 0,8	(3) 1,2	(4) 1,6	(5) 0,4	(6) 0,8	(7) 1,2	(8) 1,6
Lepra	H.S.	+	++	++	++	+	+	+	++
	K.S.	+	+	+	++	±	+	+	±
	O.W.	+	+	++	++	+	+	+	+
	T.T.	—	—	±	+	—	—	—	±
Gesunde	I.S.	—	—	—	±	—	—	—	—
	T.S.	—	—	—	±	—	—	—	+
	K.U.	—	—	±	+	—	—	±	—

Nach diesen Versuchen war die Reaktion bei Reagenzien, in die 1,4 ccm 1% Lecithin-Lösung, 0,6 ccm 1% Kephalin-Lösung und

1,2 ccm oder mehr 0,1% Cholesterin- oder Protagon-Lösung gemischt wurde, nicht spezifisch und bei 0,8 ccm od. weniger war sie bei hoher Konzentration stärker. Die Reaktionsstärke des Lepra-Serums steht parallel zur Konzentration des Choletserins oder Protagons. Die auch im Serum von Gesunden schwach positive Reaktionsstärke läuft parallel mit der des Lepraserums. Dies ist jedoch im Vergleich zum Cholesterin beim Protagon nicht nur deutlicher, sondern es kamen auch Fälle vor, wo bei stark konzentrierterm Reagenz die Spezifität sogar gehemmt wurde.

*D. Über die Herstellung der Reagenzien aus Kephalin
gemischt mit Lecithin.*

1) Wenn man bei den Herstellung der kolloidalen Lösung durch die Mischung von konzentrierte ätherischer Kephalin-Lösung zur physiologischen Kochsalzlösung zu schnell verfährt und die Lösung auf einmal eingiesst, erhält man eine grofloekige Fällung. Auch mit meiner Tropfmethode war es bei einer grossen Menge von Kephalin schwer, immer eine Lösung ohne Fällung herzustellen. Als aber Kephalin und Lecithin zusammen zu einer Äther-Lösung gemacht und diese in die physiologische Kochsalzlösung gegeben oder zuerst der physiologischen Kochsalzlösung Lecithin-Lösung beigegeben, der so entstandenen kolloidalen Lösung ätherische Kephalin-Lösung hinzugefügt wurde, wurde der Zweck leicht erreicht.

Diesen Tatsachen zufolge nimmt man an, dass das Lecithin den kolloidalen Zustand des Kephals schützt. Wenn man die gegenseitigen quantitativen Beziehungen betrachtet, stellt sich heraus, dass, wenn bei 1% alkoholischer Lecithin-Lösung und 1% ätherischer Kephalin-Lösung die Kephalinmenge die des Lecithins übersteigt, leicht eine Kephalin-Fällung entsteht.

1% Lecithin-Lösung (ccm)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
1% Kephalin-Lösung (ccm)	9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1
Fällungsergebnis	++ ++ + + - - - - -

2) Eine kolloidale Lösung aus 3 ccm 1% Lecithin, 2 ccm 1% Kephalin-Lösung und 24 ccm physiologischer Kochsalzlösung und dieselbe Mischung mit Zusatz von 3 ccm 0.1% Cholesterin wurde in

Zimmertemperatur stehen gelassen. Bei der ohne Zusatz des Cholesterins hatte sich nach 11 Tagen noch keine Fällung gebildet, bei der mit Zusatz jedoch nach 5 Tagen eine grosse Menge.

3) Man stellte diese beiden kolloidalen Lösungen her und gab jeder ein halbes Volumen desselben Serums von Gesunden bei. Bei der Lösung ohne Cholesterin dauerte das Auftreten der Fällung zweimal so lang, im Vergleich zu der mit Cholesterin.

Reagenzien	Ohne Serum	Mit Gesundenserum	Mit Lepraserum
Lecithin + Kephalin	11 Tage	48 Stunden	3 Stunden
Lecithin + Kephalin + Cholesterin	5 „	26 „	1½ „

Auch bei Protagon zeigte sich eine ähnliche Neigung wie beim Cholesterin, doch war diese nicht stark.

4) Nach dieser Tatsache habe ich, bei der Herstellung des Reagens ausser der früher beschriebenen noch folgende Methode gebraucht:

a) Ich gab in den Erlenmeyer'scheen Kolben 1 ccm 1% ätherische Kephalin-Lösung und 3,5 ccm 1% alkoholische Lecithin-Lösung, erhitzte dies im Wasserbad und entfernte die Lösungsmittel. Dann fügte ich 2,5 g Kochsalz hinzu, mischte 30 ccm destilliertes Wasser bei und schüttelte tüchtig. Der grösste Teil löste sich auf und es bildete sich eine kolloidale Lösung.

b) 30 mg Kephalin und 70 mg Lecithin wurden mit dem Deckglas gewogen und mit dem Glass zusammen in einen Mörser getan, dem 5 g Kochsalz beigelegt wurde. Während gut verrührt wurde, gab man 60 ccm destilliertes Wasser bei und erhielt eine kolloidale Lösung.

c) 3 ccm 1% ätherische Kephalin-Lösung und 7 ccm ätherische Lecithin-Lösung wurden in einen Mörser getan und 5 g Kochsalz beigelegt. Indem man gut verrührte, blies man Luft durch, wodurch der Äther verflog; darauf wurde die Lösung brei- und schliesslich salbenartig. Während man diesem 60 ccm destilliertes

Wasser beimischte, rührte man und stellte eine kolloidale Lösung her.

Diese drei und die nach der vorigen Methode hergestellten Reagenzien gebrauchte man und prüfte die Fällungsreaktion.

TABELLE XXIX.

Serum	Reagenz	a	b	c	nach der vorig. Method. hergestellt.
Lepra	T.S.	—	+++	—	—
	H.S.	+++	+++	+++	+++
	O.W.	—	—	+++	+++
	I.B.	—	—	—	—
Gesunde	Y.K.	—	—	—	—
	N.H.	—	±	—	—

Bei a) war die Positivität niedrig, b) zeigte eine unspezifische Reaktion und nur c) zeigte gleiche Resultate wie die nach der vorigen Methode hergestellten Reagenzien, keine Unspezifität und der Positivitätssatz war höher als bei a). Zur Herstellung des mit Lecithin und Kephalin gemischten Reagenzes ist die verhältnismässig einfache Methode von c) auch empfehlenswert. Wenn man beim Mischen von 7 ccm 1% Lecithin-Lösung und 3 ccm 1% Kephalin-Lösung zu 30 ccm physiologischer Kochsalz-Lösung, eine Menge unter 1-5 ccm 0,1% Cholesterin- oder Protagon-Lösung braucht, kann man leicht eine stabile Lösung herstellen, jedoch bei über 8 ccm kommt häufig eine Fällung vor.

VII. ZUSAMMENFASSUNG.

Wenn man alle Experimente zusammenfasst, ergibt sich folgendes Endergebnis.

1) Bei Herstellung des Reagenz mit alkoholischer Lecithin (Sankyo)-Lösung, alkoholischem Peripheri-Nervenextrakt und physiologischer Kochsalzlösung ist es besser statt der schnellen Mischungsmethode die Methode der "tropfenweisen" Zugabe zu gebrauchen, da man das durch diese Methode hergestellte Reagenz verhältnismässig lange gebrauchen kann.

2) Als Reagenzmittel kann man anstelle der Peripherie-Nerven Gesunder die Leprakranker oder von Kaninchen gebrauchen; das Resultate der Reaktionen sind kaum verschieden.

3) Statt Sankyo-Lecithin gebrauchte man selbsthergestelltes Rein-Lecithin; die Reaktionsstärke war schwächer als die mit Sankyo-Lecithin und die Positivität und Stärke der Reaktion standen zu der Reinheit des Lecithins im umgekehrten Verhältnis.

4) Zwischen der Kubokawa'schen Stammlösung, der zweimal verdünnten und zwei- und viermal konzentrierten Lösung war kein grosser Unterschied in der Reaktionsstärke auf das Lepraserum, und bei vier- und mehrmaliger Verdünnung wurde sie je nach deren Grad schwächer.

5) Das, was im Kubokawa'schen Reagenz besonders die spezifische Reaktion des Lepraserums hervorruft, ist besonders das dem Lecithin beigemischte Kephalin. Lecithin ruft auch ähnliche, doch nicht so starke Wirkung hervor. Wenn man aus dem Lecithin das Kephalin entfernt, wird die Reaktion je nach der Reinigung schwächer, und aus dieser Tatsache schliesst man, dass die durch Lecithin hervorgerufene Reaktion durch das noch darin enthaltenen Kephalin bedingt ist. Die wichtigste Rolle des in dem Reagenz enthaltenen Lecithins ist, den kolloidalen Zustand des Kephals zu schützen. Man kann wohl sagen, dass das im Nervenextrakt und Lecithin enthaltene Cholesterin und Protagon keine notwendigen Substanzen für die Serumreaktion selbst, sondern solche, die bei Mischung von Reagenz und Serum die Veränderung des Zustandes der dispersen Phasen beschleunigen.

6) Ich analysierte das Kubokawa'sche Reagenz und stellte die Menge der Lipoiden darin fest.

Nach dem Verhältnis dieser Menge der Lipoiden stellte ich aus möglichst rein dargestellten Lecithin, Kephalin, Cholesterin und Protagon die Mischungen her, prüfte mit diesen Mischungen die Fällungsreaktion des Lepraserums und stellte die Mischung, welche die höchste Positivität und Stärke der Reaktion zeigte fest.

7) Nach den obigen Resultaten kann man schliesslich sagen, dass die spezifische Eigenschaft des Kubokawa'schen Reagenz für die Fällungsreaktion des Lepraserums nur durch das im

Reagenz enthaltene Kephalin bedingt ist.

Die Ausführung dieser Arbeit wurde durch den Japanischen Verein zur Bekämpfung der Lepra ermöglicht, wofür ich an dieser Stelle danken möchte.

LITERATUR.

- Eitner (1906): Wien. klin. Wschr., **19**, 1555.
Embden (1921): Z. f. physiol. Chem., **113**, 138.
Kagawa (1913): J. Osaka med. Soc., **12**, 1119.
Kubokawa (1930): Japanese J. Derm. a. Uro., **30**, 914.
Levene and Rolf (1919): J. of Biolog. Chem., **40**, 1.
Mitsuda (1909): Tokyo Iji Shinshi, **1141**, (Heft 1617).
Miyoshi (1930): Japanese J. Derm. a. Uro., **30**, 890.
Nojima (1930): Lepra, **1**, 1.
Parnas (1909): Biochem. Z., **22**, 411.
Borges u. Meier (1908): Berl. Klin. Wschr., **45**, 731.
Sakakibara (1935): Lepra, **6**, 533.
Sakurai (1926): Japanese J. Derm. a. Uro., **26**, 281.
Sueyoshi (1931): J. of Biochem., **13**, 145.
Teruuchi and Toyoda (1909): Japanese J. Derm. a. Uro., **9**, 388.
Toyama (1930): Japanese J. Derm. a. Uro., **30**, 887.
Tsurumi (1912): Saikingaku Zasshi, **195**, 1.
Wechselmann u. Meier (1908): Deutsch. med. Wschr., **34**, 1340.

THE ACTION OF TUMOUR TISSUE ON HEXOSEDIPHOSPHORIC ACID.

By

KAZUO TSUZUKI.

*(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical College.
Director: Prof. N. Ariyama.)*

(Received for publication, March 9, 1936)

While the study on muscle glycolysis has made steady advance, remarkably little evidence has been available for the elucidation of mechanism of tumour glycolysis. The trend of opinion at present is toward the view that the mechanism of glycolysis in tumour tissue is quite different from that in muscle tissue. That tumour tissue produces lactic acid from glucose without phosphorylation of the sugar molecule is regarded as the most characteristic difference. However, Franks(1932), and Willheim and Schmerler(1932) pointed out that there was an indication for phosphorylation of some unknown nature in the glycolysis of Crocker 180 mouse sarcoma and of Ehrlich mouse carcinoma. The production of lactic acid from hexosephosphates, though to far a less extent than from glucose, was reported by Downes (1929) with slices of Sugiyura rat sarcoma on "hexosephosphate", by Scharles and his co-workers (1935) with the extract of mouse sarcoma No. 180 on hexosediphosphate, and by Boyland and Boyland (1935 ii) with extracts of various tumours on hexosediphosphate in the presence of large amounts of adenosinetriphosphoric acid. Boyland and Mawson (1934) stated that the slices of Jensen rat sarcoma produced lactic acid from hexosemonophosphoric acid. Scharles and his co-workers observed the similar phenomenon with the use of the extract of mouse sarcoma.

In the light of the Embden-Meyerhof hypothesis on the production of lactic acid from hexosediphosphoric acid by muscle tissue, the present writer examined whether tumour tissue could form lactic acid from hexosediphosphoric acid, and, if so, whether

the process of glycolysis would be the same as that of muscle tissue. It was found that Kato spindle cell sarcoma of rabbit produced a small quantity of lactic acid in the presence of hexosediphosphoric acid, but that the lactic acid formation did not follow the process involved in the Embden-Meyerhof hypothesis. The process was found to be blocked at the following three points: The dismutation of triosephosphoric acid into phosphoglyceric and glycerolphosphoric acids; the conversion of phosphopyruvic acid into pyruvic acid; the dismutative change of pyruvic acid into lactic acid in the presence of α -glycerolphosphoric acid.

EXPERIMENTAL.

The tumour used was exclusively Kato spindle cell sarcoma of rabbit in the form of slices or extracts. The extracts were made by shaking the minced tissue with suitable quantities of water at 0°C, and filtering after 20 minutes through cotton cloth. Phosphoglyceric acid was prepared by the Neuberg and Kobel method (1933). Glycerolphosphoric acid used was calcium glycerinum phosphoricum neutrale Merck which was purified by the method of Meyerhof and Kiessling (1933). The determination of triosephosphoric acid was performed by estimating the alkali-labile phosphoric acid; phosphoric acid by the Briggs (1922) method; glycerol by the Pregl method (1922); phosphopyruvic acid by the Lohmann and Meyerhof method (1934); pyruvic acid by the Case method (1932); lactic acid by the Friedemann, Cotonio and Shaffer method (1927).

I. Formation of triosephosphoric acid from hexosediphosphoric acid.

Nakamura (1935) pointed out that the autolyzed sarcoma tissue of rabbit was capable of producing triosephosphoric acid from hexosediphosphoric acid. The initial velocity of the formation of triose-ester was far smaller in tumour than in muscle, but later the extent of the formation reached approximately the same level in both tissues, as the production of the ester took place steadily in tumour tissue while it gradually declined after rising

to a maximum in the other tissue. Boyland and Boyland (1935) confirmed recently this finding, using the fresh extracts of various tumours of rat and mouse. Another example of the production of triosephosphoric acid from hexosediphosphoric acid by slices and cell-free extract of rabbit sarcoma is here presented in Table I.

TABLE I.
Formation of Triosephosphoric Acid from Hexosediphosphoric Acid
by Tumour and Muscle Tissue.

In 100 cc.:

8 gm. of tumour or muscle slices, or 30 cc. of cell-free tumour extract + 400 mg. of Na-hexosediphosphate + 20 cc. of pH 7 boric acid-borax buffer, 37°C.

Time (min.)	Triosephosphoric acid produced (mg.%)		
	Tumour slices	Tumour extract	Muscle slices
1	2.5	—	29.4
5	12.0	8.7	44.1
10	23.6	21.4	53.9
30	47.7	44.1	47.9

II. Formation of glycerolphosphoric acid and phosphoglyceric acid from hexosediphosphoric acid.

The dismutation of two molecules of triosemonophosphoric acid into α -glycerolphosphoric acid and phosphoglyceric acid can be examined by determining either of the reaction-products. Glycerolphosphoric acid is preferable for this purpose, since glycerol can be determined accurately by the Pregl micro method while the reliable measuring method of phosphoglyceric acid has not yet been established.

100 cc. of the fluid to be examined contained the following quantities of substances: 400 mg. of sodium hexosediphosphate, 8 gm. of slices or 500 cc. of 1:3 extract of tumour tissue, 3.5 cc. of 25% Na_2SO_3 or 5 cc. of 0.2 N NaF, and 5 cc. of 2.6% NaHCO_3 or 10 cc. of pH 7.0 phosphate buffer solution. Glycerolphosphoric acid and lactic acid were determined at the beginning and after 3 hours' incubation at 37°C. Pyruvic acid was also examined when

sulphite was added. Sulphite was added so as to arrest glycerol-phosphoric acid by stabilizing pyruvic acid which would be formed from phosphoglyceric acid and would react with the glycerol-phosphoric acid once formed. Fluoride was used for a similar purpose as sulphite, that is, to prevent the further dismutative reaction of glycerolphosphoric acid once formed with pyruvic acid by inhibiting the production of the latter substance from phosphoglyceric acid.

Under experimental conditions no indication at all was obtained of the formation of glycerolphosphoric acid or free glycerol. The production of pyruvic acid was also missed in the presence of sulphite. The boiled juice of muscle or adenosinetriphosphoric acid+magnesium did not improve the results. The addition of large amounts of adenosinetriphosphoric acid (300 mg. of sodium salt at the beginning, or 150 mg. twice at the beginning and after 1½ hours) failed too. Thus it was clearly shown that tumour slices or extracts were incapable of dismutating triosephosphoric acid into phosphoglyceric and glycerolphosphoric acids. It was often observed that a certain amount of methylglyoxal was produced from hexosediphosphoric acid in the presence of sulphite. A part, at least, of the methylglyoxal might be formed by the spontaneous conversion of the triosephosphoric acid which accumulated in a large quantity in the presence of sulphite. The results obtained in the presence of sulphite are given in Table II.

III. Formation of phosphopyruvic acid and pyruvic acid from phosphoglyceric acid.

Slices and extracts of tumour tissue lacked in the ability to produce pyruvic acid and to liberate inorganic phosphoric acid from phosphoglyceric acid. However, there appeared a phosphate fraction which was hydrolysable by N HCl at 100°C. This corresponded to the phosphopyruvic acid fraction of Lohmann and Meyerhof (1934). In the present experiments the phosphoric acid which was liberated after 60 minutes' hydrolysis was reckoned as phosphopyruvic acid. Schuchardt and Vercellone (1935) observed that Jensen rat sarcoma converted di- and monophos-

TABLE II.

Formation of Glycerolphosphoric Acid and Phosphoglyceric Acid from Hexosediphosphoric Acid.

Time of incubation: 3 hours. Temperature; 37°C. The quantities of inorganic P and lactic acid produced in control experiments which were carried out without the substrate, were subtracted from their quantities in the main experiments.

		I	II	III
Experimental conditions	Na-hexosediphosphate	440 mg.	440 mg.	440 mg.
	2.6% NaHCO ₃	5 cc.	5 cc.	5 cc.
	Na-adenosinetriphosphate	—	—	20 mg.
	MgCl ₂	—	—	17 mg.
	25% Na ₂ SO ₃	—	3.5 cc.	3.5 cc.
	Tumour slices	8 gm.	8 gm.	8 gm.
	Aq. dest.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.
Substances produced (mg.%)	Inorganic P	3.76	6.29	8.09
	Triosemono-phosphoric acid	91.29	145.18	149.74
	Methylglyoxal	+	5.33	5.74
	Glycerol (free and bound)	0	0	0
	Pyruvic acid	0	0	0
	Lactic acid	24.64	23.52	23.36

phoglyceric acid into pyruvic acid after a very long incubation.

The addition of the co-enzyme system of muscle glycolysis, that is, the boiled juice of muscle tissue, adenosinetriphosphoric acid or muscle adenylic acid, greatly changed the feature of the reaction mentioned above. The acid-hydrolysable phosphate disappeared, and there appeared pyruvic acid and inorganic phosphate. The effect of the co-enzyme system was observed not only in the slices, but also in the cell-free extracts and the thoroughly ground tissue hashes. The boiled juice of tumour tissue had practically no effect on the conversion of phosphopyruvic acid into pyruvic acid. The results are summarized in Table III. Occasionally the production of a small amount of lactic acid was noticed.

TABLE III.
Formation of Phosphopyruvic Acid and Pyruvic Acid from Phosphoglyceric Acid by Slices and Extracts of Tumour Tissue.
Time of incubation: 2 hours. Temperature: 37°C.

		I	II	III	IV	V	VI	VII
Conditions	Na-phosphoglycerate	—	50 mg.	50 mg.	50 mg.	50 mg.	50 mg.	50 mg.
	Na-glycerophosphate	—	—	47 mg.	—	—	—	—
	2.6% NaHCO ₃	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
	Boiled juice of muscle (1:4)	—	—	—	—	20 cc.	—	—
	Boiled juice of tumour (1:4)	—	—	—	20 cc.	—	—	—
I	Na-adenosinetriphosphate	—	—	—	—	—	20 mg.	—
	Adenylic acid	—	—	—	—	—	—	20 mg.
	Aq. dest.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.
	Inorg. P	1.4	1.6	1.9	1.8	—	—	—
	Pyruvic acid	0	0	0	0.8	—	—	—
II	Lactic acid	7.4	11.0	11.0	11.0	—	—	—
	P	—	1.2	—	—	—	8.3	7.9
	Pyruvic acid	—	0	—	—	—	12.5	12.6
	Lactic acid	—	0	—	—	—	0	0
	P	—	3.7	—	—	8.1	—	—
III	Phosphopyruvic acid	—	12.4	—	—	0	—	—
	Pyruvic acid	—	0	—	—	10.6	—	—
	Lactic acid	—	4.3	—	—	4.3	—	—
	P	—	—	—	—	—	—	—
	Phosphopyruvic acid	—	—	—	—	—	—	—
IV	Pyruvic acid	0.6	0.9	—	—	7.1	—	—
	Lactic acid	0	9.9	—	—	0	—	—
	P	0	0	—	—	9.1	—	—
	Pyruvic acid	0	0	—	—	0	—	—
	Lactic acid	0	0	—	—	0	—	—

This was especially the case when sliced or hashed tumour tissue was employed. The quantity of the acid was within a range of several milligrammes. The simultaneous presence of glycerol-phosphoric acid had no improving effect on the formation of lactic acid.

It can be gathered from these facts that tumour tissue is provided with the enzyme to convert phosphoglyceric acid into phosphopyruvic acid, but the tissue is unable to decompose the latter substance further into its components. The necessity of the co-enzyme system of muscle glycolysis for the hydrolysis of phosphopyruvic acid, suggests the presence of the corresponding enzyme in the tissue. Braunstein (1934) assumed that the failure of tissues, as shown in Barrenschæen and Beneschowsky's experiments (1933), to produce pyruvic acid from phosphoglyceric acid might be due to the impermeability of the substrate through the cell membrane. On the basis of this assumption Braunstein observed that the acetone-dried rat sarcoma decomposed phosphoglyceric acid into pyruvic acid. The present writer also found that the acetone-dried, or frozen tumour tissue produced a small amount of pyruvic acid, and the addition of the co-enzyme system improved the yield of pyruvic acid remarkably. However, the problem of the permeability of the cell membrane for the substrate fades away in view of the activation of the cell-free tumour extract by the co-enzyme system of glycolysis.

There is a possibility that the inability of tumour tissue to produce pyruvic acid from phosphoglyceric acid may be caused by the rapid destruction of the co-enzyme during the preparation of slices or extracts. Boyland (1932) showed the possible existence of adenosinetriphosphoric acid in Jensen rat sarcoma, and Boyland and Boyland (1935 i and ii) observed the very rapid destruction of the substance in the frozen tumour tissue. The present writer noticed that adenosinetriphosphoric acid rapidly liberated 2 molecules of phosphoric acid in the presence of the tumour extract, but that only about 10% of the total adenine-nucleus was deaminized.

He also found that there was another way to produce pyruvic

acid from phosphoglyceric acid by tumour tissue. This was the addition of phosphatase which was freed from glycolytic enzyme, to tumour tissue. The production of pyruvic acid seemed to be due to the simple hydrolysis of phosphopyruvic acid by phosphatase. It is shown in Table IV that on the addition of phosphatase, the phosphopyruvic acid fraction was replaced by the

TABLE IV.
Formation of Pyruvic Acid from Phosphoglyceric Acid by Tumour Extract
in the Presence of Phosphatase.
Temperature: 37°C.

		I	II	III	IV
Conditions	Na-phosphoglycerate	50 mg.	50 mg.	50 mg.	50 mg.
	2.6% Na ₂ HCO ₃	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
	Extract(1:1.5)	—	30 cc.	30 cc.	30 cc.
	Phosphatase	4 cc.	—	4 cc.	4 cc.*
	Aq. dest.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.
Inorg. P (mg.%)	Incubation:				
	3 hours	5.98	0.98	9.85	1.14
	6 hours	6.16	1.72	10.74	12.13
Phosphopyruvic acid (mg.%)	3 hours	0	8.13	0	4.82
	6 hours	0	7.15	0	0
Pyruvic acid (mg.%)	3 hours	0	0	6.91	0
	6 hours	0	0	6.02	6.55
Lactic acid (mg.%)	3 hours	0	0	0	0
	6 hours	0	0	0	0

* Phosphatase was added after 2 hours' incubation of phosphoglycerate with tumour extract.

pyruvic acid fraction. The action of phosphatase is indicated more clearly in Column IV of the Table: On the addition of phosphatase after the previous incubation of phosphoglyceric acid with the tumour extract, the phosphopyruvic acid which had accumulated was converted into pyruvic acid with the simultaneous liberation of inorganic phosphate. The phosphatase used in the present ex-

periments was prepared from rabbit kidney by the Erdtman method. The presence of magnesium accelerated the production of pyruvic acid which belonged to this type, while it had no effect on the reaction of the other type mentioned above.

IV. *Reaction between pyruvic acid and glycerolphosphoric acid.*

The last point to be examined was the final phase of the Embden-Meyerhof reaction, that is, the formation of lactic acid from pyruvic acid in the presence of α -glycerolphosphoric acid. Boyland and Mawson stated that slices of Jensen rat sarcoma produced lactic acid from the mixture of pyruvic acid and α -glycerolphosphoric acid. Scharles and his co-workers reported preliminarily that lactic acid was formed from the mixture of phosphoglyceric acid and glycerolphosphoric acid by mouse sarcoma No. 180.

However, the present writer obtained no definite indication of the production of lactic acid by slices or extracts of tumour tissue, though there was always a tendency to the production of a very small quantity of lactic acid from pyruvic acid. The addition of large quantities of adenosinetriphosphoric acid to the enzyme system, or the simultaneous presence of glycerolphosphoric acid did not increase the quantity of lactic acid (Table V).

The conclusion reached from the facts mentioned in the foregoing chapters is that lactic acid cannot be produced from hexosediphosphoric acid by tumour tissue, following the process of Embden-Meyerhof's theory. Though the reactions, which are reversible, and which take place without much energy change, are also carried out by tumour tissue, the process of glycolysis is interrupted by the failure of the following reactions: The dismutation of triosephosphoric acid into phosphoglyceric and glycerolphosphoric acids; the dephosphorylation of phosphopyruvic acid into pyruvic acid; the conversion of pyruvic acid into lactic acid in the presence of α -glycerolphosphoric acid.

TABLE V.
Formation of Lactic Acid from Pyruvic Acid in Presence and Absence of
Glycerolphosphoric Acid.
Temperature: 37°C.

		I	II	III	IV
Experimental Conditions	Na-pyruvate	—	200 mg.	200 mg.	200 mg.
	Na-glycerol-phosphate	—	—	167 mg.	167 mg.
	2.6% NaHCO ₃	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
	Tumour extract	30 cc.	30 cc.	30 cc.	30 cc.
	Na-adenosinetri-phosphate	—	—	—	200 mg.
	Aq. dest.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.
Lactic acid (mg.%)	Incubation:				
	1½ hours	2.5	3.2	3.4	4.5
	3 hours	3.2	4.7	5.0	5.0

V. *Formation of lactic acid from hexosediphosphoric acid.*

It may be anticipated from the results mentioned above that tumour tissue will not produce lactic acid from hexosediphosphoric acid, if the Embden-Meyerhof process is the only way of glycolysis.

Nevertheless, the production of lactic acid from hexosediphosphoric acid by tumour tissues has been repeatedly observed by Downes, Boyland, Scharles and others, but to far a less extent than that from glucose. The present writer thinks, however, that before a justifiable conclusion is reached, consideration must be paid to the following points. First of all the indirect method of measuring lactic acid, such as the manometric method, is to be avoided, as the results obtained by this method may be easily influenced by unexpected causes. Even the direct method of the Clausen principle is not absolutely free from the influence of the presence of some other substances, when very small quantities of the acid are to be dealt with. It is of special significance that the alkalinity of the copper-line method which is usually employed to precipitate sugar before the determination of lactic acid, is strong enough to produce a considerable amount of lactic acid from the

triosephosphoric acid which is always present when hexosediphosphoric acid is used as the substrate. In experiments lasting several hours, there appears gradually methylglyoxal which is further converted into lactic acid by glyoxalase. There is danger of the production of lactic acid from hexosediphosphate by a minute amount of blood or tissue juice which adheres to tumour tissue. The difference in the species of tumours may have some influence upon glycolysis. It is not clear if the investigators listed above were sufficiently aware of these points.

The present writer prepared a correction table for the production of lactic acid from triosephosphoric acid by determining the quantities of lactic acid formed from known amounts of triose-ester by the copper-line alkalinity under standard conditions, and the lactic acid values were corrected according to the amounts of triose-ester present. Occasionally triose-ester was precipitated off with 2:4-dinitrophenylhydrazine before the determination of lactic acid. To avoid the accumulation of methylglyoxal the experiments did not extend over 3 hours. The adhesion of juices of other tissues to tumour tissue was excluded by using the inner, non-necrotized part of the tissue, or by washing, in some cases, the tumour slices with physiological saline solution.

In the majority of the present experiments (Table VI), in spite of attention to all these points a certain amount of lactic acid was produced from hexosediphosphoric acid by tumour tissue. This was especially the case when the tissue slices were used. The extract of tumour tissue which is incapable of producing lactic acid from glucose, formed the acid from hexosediphosphate (Column III and VI in Table VII). Contrary to the statement of Boyland and Boyland (1935 ii) the supply of adenosinetriphosphoric acid and adenylic acid had no noticeable influence on the production of lactic acid. The amounts of lactic acid were far less than those formed from glucose; but they were of such amounts as to be worthy of attention. It may not be impossible that hexosediphosphoric acid is hydrolyzed by phosphatase contained in tumour tissue and produces glucose which is, in turn, converted into lactic acid by the glycolytic enzyme system of tumour tissue. However, the addition

TABLE VI.
Production of Lactic Acid from Hexosediphosphoric Acid.
Temperature: 37° C.

		I	II	III	IV
Conditions	Na-hexosediphosphate	—	500 mg.	500 mg.	500 mg.
	2.6% NaHCO ₃	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
	Na-adenosinetriphosphate	—	—	{300 mg. at the start, 300 mg. after 1½ hrs.	—
	Adenylic acid	—	—	—	200 mg.
	Tumour slices	6 gm.	6 gm.	6 gm.	6 gm.
	Aq. dest.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.
Lactic acid (mg.%)	Incubation:				
	1½ hours	7.09	18.00	19.03	17.55
	3 hours	9.74	26.83	26.27	27.69

of purified phosphatase to the enzyme-substrate system did not increase the yield of lactic acid at all. The contamination of glucose in the samples of hexosediphosphoric acid was excluded by repeated purification.

It was strange that the production of lactic acid from hexosediphosphate by the tumour slices was inhibited by fluoride or monoiodoacetic acid to only a slight extent, while the formation of the acid from glucose was completely stopped at the same concentration of the substances (Table VII). When the tumour extract was used fluoride exhibited no inhibitory action on the lactic acid production from hexosediphosphate. This last finding confirms the observations of Scharles and his co-workers on the effect of fluoride and iodoacetate upon the formation of lactic acid from hexosediphosphate by the tumour extract. The observations of American investigators led them to the conclusion that the mechanism of the lactic acid formation from hexosediphosphate might be different in muscle from that in tumour. Stronger evidence for this conclusion is offered by the facts mentioned in the foregoing chapters that in tumour tissue the Embden-Meyerhof process of disintegration of hexosediphosphate was blocked at several points. So far, judging from these facts, it can be said that the

TABLE VII.
Production of Lactic Acid from Hexosediphosphoric Acid in the Presence of
Fluoride and Monoiodoacetic Acid.
Temperature: 37°C.

		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Conditions	Glucose	—	—	200 mg.	200 mg.	200 mg.	—	—	—
	Na-hexosediphosphate	—	—	—	—	—	500 mg.	500 mg.	500 mg.
	2.6% NaHCO ₃	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.	5 cc.
	n/20 Na-fluoride	—	20 cc.	—	20 cc.	—	—	20 cc.	—
	Monoiodoacetic acid (neutralized)	—	—	—	—	10 mg.	—	—	10 mg.
Lactic acid (mg. %)	Aq. dest.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.	to 100 cc.
	Incubation: 1½ hours	7.20	6.93	31.32	6.62	9.83	15.75	13.17	—
	3 hours	8.55	7.83	68.76	8.85	9.83	26.32	18.90	18.49
	1½ hours	±0	±0	0	0	0	13.00	18.45	—
	3 hours	±0	±0	0	0	0	21.37	21.37	—

production of lactic acid from hexosediphosphate by tumour tissue is not the sequence of the glycolysis of the Embden-Meyerhof hypothesis. In consequence, the hypothesis of Boyland and Boyland (1935 ii) that the mechanism of the production of lactic acid is identical in muscle and tumour seems to need more experimental foundation. Thus the mechanism of glycolysis of the tumour type cannot yet be elucidated on the ground of our present knowledge of glycolysis.

SUMMARY.

Each phase of the reactions involved in the Embden-Meyerhof theory on the production of lactic acid from hexosediphosphoric acid by muscle tissue, was investigated with the employment of Kato spindle cell sarcoma of rabbit instead of muscle. The results obtained are as follows.

1. Triosephosphoric acid was produced from hexosediphosphoric acid by tumour tissue. The velocity of the reaction was, however, slower than that of muscle tissue.

2. Tumour tissue was unable to dismutate two molecules of triosephosphoric acid into phosphoglyceric and glycerolphosphoric acids.

3. The decomposition of phosphoglyceric acid into pyruvic acid was not carried out by tumour tissue, the reaction being stopped at the stage of phosphopyruvic acid. However, pyruvic acid was easily produced from phosphopyruvic acid in the presence of adenosinetriphosphoric acid and adenylic acid, or phosphatase.

4. The dismutation of pyruvic acid into lactic acid in the presence of α -glycerolphosphoric acid was not observable in tumour tissue.

5. In spite of the facts mentioned above that the process of the glycolysis of the Embden-Meyerhof hypothesis was stopped at several phases, a small amount of lactic acid was always produced from hexosediphosphoric acid by the tumour slices. The mechanism of this reaction is quite obscure at present. This reaction was inhibited only to a relatively slight degree by the quantities of fluoride or monoiodoacetic acid which completely stopped the

production of lactic acid from glucose.

REFERENCES.

- Barrenscheen, H. K. and Beneschovsky, H. (1933): *Biochem. Z.*, **265**, 159.
- Boyland, E. (1932): *J. Physiol.*, **75**, 136.
- Boyland, E. and Boyland, M. E. (1935, i): *Biochem. J.*, **29**, 1097.
- Boyland, E. and Boyland, M. E. (1935, ii): *Biochem. J.*, **29**, 1910.
- Boyland, E. and Mawson, C. A. (1934): *Biochem. J.*, **28**, 1409.
- Braunstein, A. E. (1934): *Biochem. Z.*, **272**, 21.
- Briggs, A. P. (1922): *J. Biol. Chem.*, **53**, 13.
- Case, E. M. (1932): *Biochem. J.*, **26**, 753.
- Downes, H. E. (1929): *J. Cancer Research*, **13**, 268.
- Franks, W. R. (1932): *J. Physiol.*, **74**, 195.
- Friedemann, T. E., Cotonio, M. and Shaffer, P. A. (1927): *J. Biol. Chem.*, **73**, 335.
- Lohmann, K. and Meyerhof, O. (1934): *Biochem. Z.*, **273**, 60.
- Meyerhof, O. and Kiessling, W. (1933): *Biochem. Z.*, **264**, 40.
- Nakamura, S. (1935): *J. Biochem.*, **21**, 9.
- Neuberg, C. and Kobel, M. (1933): *Biochem. Z.*, **264**, 456.
- Pregl, F. (1922), *Die quantitative organische Mikroanalyse*, p. 178.
- Scharles, F. H., Baker, M. D. and Salter, W. T. (1935): *Biochem. J.*, **29**, 1927.
- Schuchardt, W. and Vereellone, A. (1935): *Biochem. Z.*, **276**, 280.
- Willheim, R. and Schmerler, J. (1932): *Biochem. Z.*, **254**, 355.

FORSCHUNG ÜBER DIE SERUMREAKTION DER LEPRA.

Untersuchungen über Kephalin als Reagens der Fällungs- reaktion des Lepraserums.

VON

IHOE SAKAKIBARA.

(Aus dem Biochemischen Institut der Medizinischen Akademie
Kumamoto. Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.)

(Eingegangen am 11. März 1936)

Meine frühere Arbeit (1935) prüfte die Fällungsreaktion nach Kubokawa (1930). Nachher untersuchte ich ferner die Natur der Reagenzien und stellte fest, dass die Substanz, welche in der Reaktion die Hauptrolle spielt, das Kephalin ist.* Die physiologische Bedeutung des Kephalin findet man nur in der Blutgerinnungslehre. Ich habe nun seine Antigenität auf das Lepraserum gefunden. Daraus folgt, dass es darauf ankommt zu untersuchen, ob durch chemische Behandlungen die Fähigkeit des Reagens für die Fällungsreaktion sich verändert und ferner, welche Art von Kephalin diese Fähigkeit hat. Die Tatsache, dass es über dieses Problem frühere Forschungen nicht gibt, veranlasst mich, in der vorliegenden Mitteilung die Resultate der Experimente zu veröffentlichen.

EXPERIMENT.

Methode und Materialien: Die Fällungsreaktion wurde durch das Verfahren der Ballungsreaktion nach Müller (1926) untersucht und zur Darstellung des Kephalins wurde die Methode nach Levene u. Rolf (1919), und Sueyoshi (1931) gebraucht. Die anderen einzelnen Methoden sind bei jedem Experiment einzeln beschrieben. Das Lepraserum als Versuchsmaterial stammt von

* Siehe meine vorangehende Mitteilung dieses Hefts.

Kranken in Tairoin zu Kumamoto, das als Kontrolle gebrauchte luetische Serum bekam ich von der Klinik unserer Akademie.

I. Einfluss der Temperatur.

Bei der Herstellung kolloidarer Lösung von Kephalin vermischt man die ätherische Kephalinlösung mit physiologischer Kochsalzlösung, schüttelt kräftig und vertreibt durch Luftzufuhr unter Erwärmen den Äther.

Um es klar zu machen, wie dabei das Erwärmen die Fähigkeit des Kephalsins als Reagenz beeinflusst, mischte ich die 2 ccm 1% ätherischer Kephalinlösung mit 40 ccm physiologischer Kochsalzlösung, schüttelte und verteilte je 10 ccm der entstandenen kolloidaren Lösung in vier Kolben. Dann wurde der erste Kolben 1 Stunde lang in Zimmertemperatur (1), der zweite 1 Stunde im Thermostat von 37° (2), der dritte ebenfalls 1 Stunde lang in 56° stehen gelassen (3) und der vierte in kochendem Wasserbad 30 Minuten lang erhitzt (4). Nachher verdünnte ich jede Lösung mit Kochsalzlösung zweimal, schüttelte sie kräftig. Die so erhaltenen 4 Lösungen wurden auf die Fällungsreaktion des Lepra-Serums geprüft, die Resultate sind in Tabelle I gezeigt.

TABELLE I.

Reagenz		Behandlungsmethode			
Serum		(1)	(2)	(3)	(4)
Gesunde	M.K.	—	—	—	—
	T.T.	—	—	—	—
Syphilis	N.F.	—	—	—	—
	O.Y.	—	—	—	—
	N.Y.	—	—	—	—
Lepra	M.F.	—	—	—	—
	S.M.	+++	+++	+++	+++
	M.R.	—	—	—	—
	N.O.	++	++	++	++

Daraus folgt, dass das Erwärmen von solchem Grad die Fähigkeit des Kephals als Reagenz bei der Fällungsreaktion nicht beeinflusst.

II. Einfluss des beigemischten Äthers.

Das in Zimmertemperatur (27°C) stehende Reagenz in dem vorigen Experiment enthielt noch Äther, zeigte aber keinen Einfluss auf die Fällungsreaktion. Ich wollte doch den Einfluss des Äthers auf die Reaktion genauer prüfen und untersuchte wie folgt.

1 cem ätherischer Kephallinlösung wurde mit 20 cem physiologischer Kochsalzlösung gemischt, geschüttelt, und eine kolloidare Lösung hergestellt. Das Resultat, welches die mit dieser Kephallinlösung geprüfte Untersuchung zeigte, war ganz gleich dem der Tabelle I.

Durch die vorigen 2 Experimenten erkannte man, dass das Erwärmen bei 100° und von kurzem Dauer und der in der Kephallinlösung zurückbleibende geringe Äther keinen Einfluss auf die Fällungsreaktion hat. Daher stellte ich bei den folgenden Experimenten die Kephallinlösung nach folgender Methode her. Das Kephallin wird in kleiner Menge Äther gelöst, diese Lösung einer bestimmten Menge von Kochsalzlösung zugefügt, kräftig geschüttelt, bei $50\text{--}60^{\circ}$ erwärmt, um den Äther zu vertreiben.

III. Die Oxydierung des Kephals.

Neu hergestelltes Kephallin ist eine körnige oder schuppige, nicht klebrige Substanz von gelblich weisser Farbe, seine 1% ätherische Lösung ist farblos und durchsichtig. Nach wenigen Tagen verfärbt es sich gelblich durch die Oxydation; nach einigen Monaten färbt es sich bräunlich oder bräunlich schwärzlich und wird klebrig und eine 0,1% oder noch mehr verdünnte ätherische Lösung solchen Kephals ist braun wie Bier.

Bei der Herstellung der kolloidaren Lösung des ganz frischen Kephals kann man höchstens 0,1% Lösung gewinnen, in höherer Konzentration keine homogene Lösung. Mit dem alten verfärbten Kephallin kann man jedoch eine durchsichtige, homogene, kolloidare Lösung von höherer Konzentration leicht herstellen.

Um nun den Unterschied der antigenösen Eigenschaft zwischen frischem und altem Kephalin zu finden, stellte ich die kolloidaren Lösungen durch Mischung von je 1 cem 1% ätherischer Lösung des frischen oder alten Kephals mit 20 cem physiologischer Kochsalzlösung her und prüfte mit diesen Lösungen die Fällungsreaktion auf das Lepra-, Syphilis- und Gesunden-Serum. Die Resultate sind in Tabelle II gezeigt. Man konnte keinen Unterschied der Antigenität zwischen diesen beiden Arten von Kephalin finden.

TABELLE II.

Serum	Reagenz	Frishes Kephalin	Veraltetes Kephalin
Gesunde	K.M.	—	—
	M.M.	—	—
	M.K.	—	—
Syphilis	O.F.	—	—
	T.T.	—	—
Lepra	T.T.	++++	++++
	N.T.	—	—
	S.T.	—	—
	G.H.	++++	++++
	D.S.	+++	+++

Dann wurde das nach Leven u. Rolf'scher Methode (1919) hergestellte Kephalin (Amino-N/Gesamt-N=91/100) zu Äther zugesetzt, in Kältemischung bei -10° gehalten, 10% Kaliumpermanganatlösung im Verhältnis von 10 Tropfen auf 10 cem der Kephalinlösung beigelegt, worauf das Kephalin teilweise oxydiert und eine gelblich braune Farbe bekam. Andererseits wurde das Kephalin, durch Zusatz von überschüssiger Menge der Kaliumpermanganatlösung vollständig oxydiert und bekam eine schwärzlich braune Farbe. Die so behandelte Kephalinlösung wurde im Vakuum abgedampft, der Rückstand je dreimal mit Alkohol und Aceton gewaschen, von Aceton befreit, in Äther gelöst, filtriert und das Filtrat im Wasserbad bei unter 50° konzentriert. Mit den auf diese Weise erhaltenen, oxydierten Kephalin und dem nicht

behandelten, frischen Kephalin wurden 0,1% kolloidare Lösungen hergestellt, mit physiologischer Kochsalzlösung zweimal verdünnt. Diese verdünnten Kephalinlösungen nahm ich als Antigen und versuchte die Fällungsreaktion des Serums. Die Resultate waren, wie Tabelle III zeigt, bei den 3 Arten gleich.

TABELLE III.

Reagenz		Kephalin		
		Nicht behandelt	Teilweise oxydiert	Vollkommen oxydiert
Syphilis	N.Y.	—	—	—
	(Wa-R)			
	W.H.	—	—	—
	(Wa-R)			
Lepra	N.B.	+++	+++	+++
	D.T.	—	—	—
	K.B.	+++	+++	+++
	M.T.	+++	+++	+++

IV. Hydrierung des Kephalins.

Die Jodzahl des aus Rinderhirn hergestellten Kephalins wurde nach dem Verfahren von Yasuda (1931) bestimmt; 32 mg Kephalin verbindet sich mit 18,796 mg Jod, die Jodzahl beträgt 53,73; also ein Molekül Kephalin verband sich drei Atomen des Jodes.

In die ätherische Lösung dieses Kephalins wurde Wasserstoff, weicher mit 10% Kaliumpermanganatlösung und dann mit 5% Natriumhydroxydlösung gewaschen wurde, drei Stunden lang zugeführt, indem man als Katalysator das nach Loew (1890) hergestellte Platinschwarz brauchte.

Die Jodzahl des hydrierten Kephalins betrug 4,2; daraus konnte man feststellen, dass 92% der ungesättigten Fettsäuren im Kephalinmolekül gesättigt wurden.

Sodann wurden je 10 mg von hydrierten und unbehandeltem Kephalin mit Alkohol und Aceton je 3 mal gewaschen und getrocknet, in je 10 cem physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Die Lösungen wurden dann zweimal verdünnt und als Antigen auf die Fällungsreaktion gebraucht.

TABELLE IV.

Reagenz		Kephalin	
Serum		Hydriert	Nicht behandelt
Gesunde	M.K.	—	—
	M.R.	—	—
Lepra	N.B.	+++	+++
	D.T.	—	—
	K.B.	+++	+++
	M.T.	++++	++++
	S.H.	+	+
	D.K.	—	—

Wie Tabelle IV zeigt, besteht kein Unterschied zwischen beiden Arten des Kephalins.

V. Die Art von Kephalin.

Es ist eine schon erklärte Tatsache, dass es beide Arten von Kephalin, nämlich α -Kephalin, unsymmetrische Form und β -Kephalin, symmetrische Form gibt, je nach der Stellung der mit Glycerophosphorsäure bindenden Fettsäure. Nischimoto und Suzuki (1932) fanden eine neue Methode, beide Formen von Kephalin von einander zu scheiden und gewannen 5,2 g α -Kephalin und 23,7 g β -Kephalin aus 36 g Kephalin des menschlichen Gehirns.

Um nun zu erklären, welche Form von Kephalin, d. h. α - oder β -Kephalin, die spezifische Antigenität für Lepra-Serum hat, stellte ich folgende Versuche an.

Aus dem nach Levene und Rolf'scher Methode (1919) hergestellten Kephalin wurde Kephalin-Cadmiumchloriddoppelsalz gebildet; das Salz wurde im Äther gelöst, filtriert, dem Filtrat pulverisiertes Ammoniumcarbonat zugesetzt; dann wurde die freigewordenes Kephalin enthaltende ätherische Lösung konzentriert, in Petroläther aufgelöst und noch einmal filtriert. Um

die beigemischten Salze zu entfernen, wurde das Filtrat mit Wasser geschüttelt, die Petrolätherschicht im Vakuum konzentriert, die konzentrierte Lösung wurde tropfenweise in Alkohol gesetzt; da schlug sich das Kephalin nieder. Nachdem dreimal wiederholt wurde, dass man das Kephalin in Petroläther löst, durch Alkohol niederschlagen lässt, wurde das in Äther gelöste Kephalin konzentriert, in Aceton zugesetzt. Der Niederschlag wurde mit Aceton dreimal gewaschen und im Vakuum getrocknet. 30 mg auf diese Weise gewonnenes Kephalin wurde in 10 ccm Wasser gelöst und der Aminostickstoff bestimmt. Bei 25° und Druck 761 mm Hg war der aus 1 ccm Versuchsmaterials gewonnen Stickstoff 0,105 ccm = 0,05835 mg. Durch Mikrokjeldalmethode erzeugt 2 ccm Kephalinlösung Ammoniak entsprechend zu 0,87 ccm $n/100$ H_2SO_4 , in 1 ccm Kephalinlösung also $N = 0,87 \times 0,1401/2 = 0,0609$ mg. Daher $\text{NH}_2\text{-N}/\text{Gesamt-N} = 96/100$. Hierauf stellte man die Phosphormenge der Kephalinlösung nach Iversen (1920) fest. Nach der Veraschung von 1 ccm Kephalinlösung gebrauchte man 2,9 ccm $n/25$ NaOH, um die Fällung des phosphormolybdensauren Ammoniums zu lösen, also $P = 2,9 \times 0,445 = 0,12905$ mg. Daher $N:P = 1:1$.

Nun wurde 1 g des Kephalins in 10 ccm Äther aufgelöst, der Lösung die 10% ammoniakalkalische, alkoholische Bleiacetatlösung beigesetzt. Die dadurch entstandene Fällung wurde nach Nishimoto und Suzuki (1932) mit Alkohol-Äther (2:1) ausgewaschen, im Vakuum getrocknet; die Waschflüssigkeit wurde in andere Kolben übergegossen. Das getrocknete Kephalinbleiacetatsalz wurde in Petroläther aufgenommen. Um Kephalinbleiacetatsalz zu fällen, wurde zur konzentrierten Petrolätherlösung Methylalkohol zugefügt. Die Fällung wurde wiederholt mit Methylalkohol gewaschen. Die gewaschene Fällung wurde im Scheidetrichter mit Äther geschüttelt, erzeugter Suspension wurde mit 1% Salzsäure schwach angesäuert und geschüttelt. Nach weiterem Schütteln wurde das Kephalin allmählich befreit und ging in die Ätherschicht über. Ätherschicht wurde getrennt, einigemal mit Wasser gewaschen, bis es nicht mehr sauer reagierte. Gewaschene ätherische Lösung wurde konzentriert, und unter Zusatz von Aceton ausgeschiedenes Kephalin von Aceton gänzlich getrennt, in Petrol-

äther gelöst, filtriert, das Filtrat konzentriert, dazu Reinalkohol zugegeben; die gewonnene Fällung des Kephalin wurde zweimal mit Alkohol, dreimal mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Andererseits wurde die Alkohol-Ätherlösung des Kephalinbleiacetatdoppelsalzes in denselben Kolben aufgenommen, in den Scheidetrichter übergegossen, Wasser zugesetzt, geschüttelt und die Kephalinbleiacetat enthaltende Ätherschicht getrennt, die ätherische Lösung konzentriert, durch Zusatz von Aceton das Kephalin-salz gefällt, wieder in Äther gelöst und wie beim oben beschriebenen Verfahren wurde aus der Ätherlösung unter Zusatz von Salzsäure das Kephalin befreit und in Vakuum getrocknet.

Von den auf diese Weise gewonnenen Kephalin ist das erstere β - und das letztere α -Kephalin. Die aus Rinderhirn-Kephalin gewonnene Menge betrug 0,13 g α -Kephalin und 0,56 g β -Kephalin. Die Proportion der beiden Substanzen ist 19:81. Das α -Kephalin dreht das polarisierte Licht nach rechts (20 cm Flüssigkeitsschicht der 1 g/dl ätherische Lösung, bei 31°, ca. $+0,13^\circ - 0,25^\circ$, also $[\alpha]_D^{30} = \text{ca.} + 6,5$), das β -Kephalin zeigte aber keine optische Aktivität mit 20 cm tiefer Schicht der 2,8% ätherische Lösung.

Um die Antigenität der drei Arten Kephalin, nämlich des α - β - und des ungetrennten Kephalin zu vergleichen, wurde 1 cm 1% ätherische Lösung von jedem Kephalin mit 16 cm physiologischer Kochsalzlösung gemischt und kolloidare Lösung hergestellt. Man brauchte diese Lösungen als Antigen; es wurde die Fällungsreaktion für Serum von Leprakranken, Syphilitikern und gesunden Personen untersucht. Die Resultate zeigt Tabelle VI.

Das β -Kephalin gab die spezifisch positive Reaktion für das Lepraserum wie bei Kephalin. Im Gegensatz dazu zeigte das α -Kephalin schwachpositive (+) oder zweifelhafte Reaktion (\pm) nicht nur für das Lepraserum, sondern auch für das Serum von Syphilitikern und Gesunden. Nachher wurde die α -Kephalinlösung zwei-, vier und achtmalig verdünnt, mit diesen verdünnten Lösungen die Fällungsreaktion versucht. Die Resultate der zweifach verdünnten Lösung waren für alle Seren zweifelhaft (\pm)

TABELLE V.

Nr.	Namen	Reagenz		Kephalin		
		Krankheit	Gesamt-	α-	β-	
1	T.K.	L.T.	—	+	—	
2	S.O.	„	+++	+	+++	
3	E.M.	„	+++	+	+++	
4	N.T.	L.N.	—	+	—	
5	N.B.	L.T.	+++	+	+++	
6	S.H.	„	++	+	++	
7	R.A.	L.N.	+	±	+	
8	D.T.	„	—	+	—	
9	T.K.	L.T.	—	+	—	
10	K.B.	„	+++	±	+++	
11	M.T.	„	+++	+	+++	
12	K.C.	„	+++	+	+++	
13	K.M.	L.M.	—	±	—	
14	G.I.	L.T.	—	±	—	
15	N.O.	„	+++	+	+++	
16	M.N.	L.N.	++	+	++	
17	M.K.	S.	—	+	—	
18	N.Y.	„	—	+	—	
19	W.H.	„	—	+	—	
20	G.T.	„	—	+	—	
21	D.M.	„	—	+	—	
22	H.T.	„	—	+	—	
23	D.O.	„	—	+	—	
24	N.M.	G.	—	+	—	
25	S.O.	„	—	±	—	
26	Z.E.	„	—	+	—	
27	J.T.	„	—	±	—	
28	M.K.	„	—	±	—	
29	S.T.	„	—	±	—	

L.T. = Lepra tuberosa

L.N. = Lepra nervosa

L.M. = Lepra mucosa

S. = Syphilis

G. = Gesund.

und bei vier- und achtfach verdünnter Lösung negativ.

Bei Herstellung der kolloidalen Lösung aus der ätherischen Kephalinlösung und physiologischen Kochsalzlösung dispergiert das α -Kephalin am schwersten und hergestellte Lösung war leicht fällbar.

VII. Eigelb- und Rinderleber-Kephalin.

Bei erwähnten Experimenten wurde immer das Kephalin des Rinderhirns gebraucht. Um festzustellen, ob nun die Antigenität bei anderem Kephalin vorhanden ist, wurde Eigelb- und Rinderleber-Kephalin hergestellt und ihre Antigenität mit dem Rinderhirn-Kephalin verglichen, indem man mit diesen Kephalin die Fällungsreaktion versuchte. Das Resultat zeigt Tabelle VII.

TABELLE VI

Antigen		Kephalin		
Serum		Eier-	Rinderleber-	Rindergehirn-
Gesunde	I.S.	—	—	—
	M.K.	—	—	—
	J.T.	—	—	—
Lepra	K.C.	+++	+++	+++
	K.I.	—	—	—
	N.O.	++++	++++	++++

Also diese drei Kephaline reagierten gleich auf das Lepraserum. Nun wollte ich aus Eigelbkephalin und Leber-Kephalin α - und β -Kephalin trennen. Aus 2 g Eigelb-Kephalin wurde 0,39 g α -Kephalin- und 1,54 g β -Kephalin-Bleiacetatdoppelsalz und aus 1 g Rinderleber-Kephalin 0,26 g α -Kephalin und 0,81 g β -Kephalin gewonnen. Die Proportion des α - und β -Kephalin ist bei Eigelb-Kephalin 21:79 und bei Rinderleber-Kephalin 24:76.

Das Resultat der Fällungsreaktion für Leprasera zeigt Tabelle VIII; α -Kephalin aus Eigelb sowie aus Rinderleber gab eine zweifelhafte Serumreaktion (\pm) für Leprakranken sowie

TABELLE VII

Reagenz		Kephalin				
		Eier		Rinderleber		Rinderhirn- β -
		α -	β -	α -	β -	
Gesunde	T.S.	\pm	—	\pm	—	—
	L.U.	\pm	—	\pm	—	—
Lepra	T.K.	\pm	—	\pm	—	—
	S.O.	\pm	+++	\pm	+++	+++
	E.M.	\pm	+++	\pm	+++	+++
	N.T.	\pm	—	\pm	—	—

Gesunden. Beide β -Formen zeigten aber die spezifische Reaktion für Lepra, wie bei dem β -Kephalin aus Rinderhirn.

ZUSAMMENFASSUNG.

Aus den oben beschriebenen Ergebnissen wird folgendes geschlossen:

1. Die Antigenität des Kephalins für Lepraserum verschwindet durch einstündige Erhitzung bei 37°, 56° und halbstündige Erhitzung bei 100° nicht.

2. Beimischung kleiner Menge Äther, welche bei der Herstellung der kolloidalen Lösung des Kephalins gebraucht wurde, beeinflusst die Antigenität des Kephalins nicht.

3. Das oxydierte oder hydrierte Kephalin erhält die spezifische Fällungsreaktion für Lepraserum.

4. Das Kephalin, das die spezifische Fällungsreaktion für Lepraserum zeigt, ist das β -Kephalin; das α -Kephalin zeigt keine spezifische Fällungsreaktion.

Diese Tatsache wurde bei allen Kephalinen, welche aus dem Rinderhirn, Rinderleber und Hühnerei hergestellt wurden, in gleicher Weise erwiesen.

5. Der Gehalt des β -Form ist in Rinderhirn-, Rinderleber- und Hühnerei-Kephalin je 81, 76, 79%.

LITERATUR.

- Iversen (1920): Biochem. Z., **104**, 22.
Kubokawa (1930): Japanese J. of Dermat. und Urol., **30**, 914.
Levene und Rolf (1919): J. of biolog. Chem., **40**, 1.
Loew (1890): Ber., **23**, 289.
Müller (1926): Arch. f. Derma. u. Syphil., **151**, 231.
Nishimoto und Suzuki (1932): Proceedings of Imperial Academy,
8, 424.
Sakakibara (1935): Lepra, **6**, 533.
Sueyoshi (1931): J. of Biochem., **13**, 145.
Yasuda (1931): J. of Biolog. Chem., **94**, 401.

LA PROPRIÉTÉ "TAMPON" DES EXTRAITS DE VIANDE ET LE COEFFICIENT D.

Par

I. A. SMORODINTSEV ET P. A. TSYGANOVA.

(Travail de l'Institut de l'industrie de la viande de Moscou.)

(Reçu pour la publication, le 2 avril 1936)

La nourriture riche en substances-tampons est, comme on le sait, plus effective que celle qui en est dépourvue.¹⁾ Voulant voir dans quel rapport les propriétés-tampon des extraits de viande se trouvent avec le degré de maturation et de qualité de la viande, nous avons cherché à déterminer leur richesse en substances-tampons en les titrant par une solution décimale de soude caustique. Dans une autre série d'expériences nous avons recherché par NaOH en milieu aqueux et alcoolique en titrant le nombre de valences acides, accumulées pendant la période durant laquelle la viande était conservée.

TECHNIQUE DE L'EXAMEN.

Conformément au procédé que nous avons adopté, nous plaçons un quart de la cuisse d'arrière de vache dans une chambre à la température de $+4^{\circ}$, et un autre quart, dans une chambre à la température de $+34^{\circ}$. A des intervalles déterminés, des portions de l'un et de l'autre sont débarrassées de la graisse et du tissu conjonctif, finement hachées par un hachoir et soumises à l'action de l'eau dans la proportion de 1 à 4 pendant une heure dans un agitateur électrique. L'extrait ainsi obtenu est ensuite soumis à l'analyse.

La richesse en substances-tampons est recherchée comme suit; à 10 cc. d'extrait dilués dans 100 cc. d'eau nous ajoutons 10 cc. d'une solution décimale de HCl pour titrer ensuite avec une solution décimale de NaOH au bromthymol bleue. La quantité

1) V. Bermann, Ztsch. f. angew. Chem., 41, 153, 1928.

d'alcali dépensé était alors évaluée en équivalents normaux, par 100 g. de viande.

Le coefficient D'est déterminé de la façon suivante¹⁾ : nous faisons précipiter 50 cc. d'extrait en y ajoutant 30 cc. de fer colloïdal à 1% et diluant par de l'eau afin d'obtenir un volume de 100 cc.; 20 cc. du filtrat sont titrés avec une solution décimale de soude caustique au phenol phtaléine jusqu'au moment où apparaît une coloration rose pâle (valeur E). Nous ajoutons en outre 20 cc. d'alcool à 96° et continuons la titration jusqu'au moment d'obtenir une coloration rose pâle (valeur F). Par coefficient D, nous entendons la différence entre F et E (F-E) évaluée en équivalents normaux de soude caustique pour 100 grammes de viande.

Les résultats des recherches, pour les trois séries, sont représentés dans les tableaux I et II.

Comme on le voit par ces 2 tableaux la richesse de la viande en substances-tampons augmente d'abord, atteint son maximum au

TABLEAU I.

La richesse en substances-tampons de la viande conservée
à la température de +4°.

Heures	1	12	48	48	72	120	240	360	432
1-ière série	0.34	0.34	0.41	0.36	0.36	0.35		0.45	0.45
2-ième „	—	—	0.35	0.32	0.32	0.49	0.47	0.43	0.43
3-ième „	0.28	0.32	0.34	0.36	0.36	0.34	0.38	0.38	0.32
Moyenne	0.31	0.33	0.37	0.36	0.36	0.39	0.42	0.41	0.40
Pourcentage par rapport à la 1-ière heure	100.0	107.3	112.5	116.2	111.7	128.2	137.8	132.5	129.9
Quantité de cm ³ de NaOH norm. pour 100 gr. de viande	2.46	2.64	2.94	2.86	2.76	3.16	3.38	3.26	3.20
Subst.-tamp. Ph $\times 10^3$	14	18	21,5	21,5	22	22,5	24,2	2,34	2,27

1) I. A. Smorodintzew et A. N. Adova, practicum de chimie biologique, p. 136, Moscou 1934 (en russe); I. A. Smorodintzew et S. A. Pawlow, Journ. de cuire URSS, 13, 598, 1937 (en russe).

TABLEAU II.

La richesse en substances-tampons de la viande, conservée
à la température de $+34^{\circ}$.

Heures	1	12	24	48	72
1-ière série	0.34	0.37	0.38	0.35	0.31
2-ième „	—	—	0.35	0.35	0.41
3-ième „	0.28	0.32	0.38	0.36	—
Moyenne	0.31	0.34	0.37	0.36	0.36
Pourcentage par rapport à la 1-ière heure	100	112.0	120.5	115.6	116.5
Quantité de cm^3 de NaOH norm. pour 100 gr. de viande	2.46	2.76	2.97	2.85	2.87
Subst.-tamp. $\times 10^3$ PH	16	20	22	20	20

bout de 24 heures, puis diminue pour augmenter de nouveau au bout de 3 jours et rester en suite au même niveau pendant tout le temps de l'observation, et cela aussi bien à la température de $+4^{\circ}$ qu'à celle de $+34^{\circ}$. En divisant le nombre de cc. d'alcali normal correspondant à 100 grammes de viande par le PH que l'extrait présente à ce moment et en multipliant ensuite le quotient obtenu par 10^3 nous obtenons le coefficient constant 22-25 qui est celui de la viande mûre.

Comme dans le processus de l'autolyse, il y a non seulement libération d'acides minéraux et organiques gras volatiles, exerçant une action directe sur la quantité d'alcali dépensé, mais aussi formation d'acides aminés et d'autres ampholytes dont le degré de dissociation ne permet pas de les titrer en milieu aqueux à l'aide de la phénolphthaléine. Nous avons recours pour connaître l'accumulation de ces ingrédients, au titrage dans un milieu alcoolique, par le procédé de Foreman.¹⁾ Nous appelons coefficient D la différence entre le titrage aqueux et la titrage alcoolique exprimée en cc. d'alcali dépensé²⁾ La valeur de ce coefficient atteint son

1) W. Foreman: Biochem. Journ., 14, 451, 1920; comp. Beloroutcheff. La pratique de laboratoire 1932, No. 1, p. 24.

2) J. A. Smorodintzev, Biochemie, p. 124, Moscou 1936 (en russe).

maximum au bout de 24 heures, puis elle tombe un peu pour s'élever de nouveau au bout de 10 jours et rester ensuite à un niveau constant correspondant à l'état de maturation de la viande. (3, 4-3, 6), ainsi qu'on le voit dans le tableau III.

TABLEAU III.
Le coefficient D à la température de +4°.

Heures	1	12	27	48	72	120	240	360	432
1-ière série	3.13	3.40	3.80	3.60	3.30	3.14	4.00	3.60	3.46
2-ième „	2.96	2.80	2.96	2.80	2.96	3.30	3.46	4.46	4.62
3-ième „	3.24	3.36	3.78	3.12	2.54	3.24	3.60	4.10	4.98
Moyenne	3.11	3.19	3.71	3.17	2.93	3.23	3.70	4.09	4.35

Dans les cas où la viande commence à se corrompre (à +34°) le coefficient D s'élève jusqu'à 6,0 (Voir le tableau IV).

TABLEAU IV.
Coefficient D à la température de +34°.

Heures	1	12	24	48	72
1-ière série	3.13	3.81	3.60	4.78	7.92
2-ième „	3.17	2.96	3.30	3.78	3.78
3-ième „	3.24	3.12	3.84	9.96	8.30
Moyenne	3.17	3.29	3.58	6.17	6.83

L'examen systématique des variations du PH des extraits de viande et de leur richesse en substances-tampons pendant tout le temps que la viande est conservée nous conduit donc à cette conclusion que ni le PH, ni la teneur plus ou moins riche en substances-tampons, ni le coefficient du rapport entre la richesse en substances-tampons et le PH ne nous indiquent le début de la corruption de la viande;¹⁾ leurs valeurs correspondent à l'état de maturité de la viande quand, par ses propriétés organoleptiques, cette dernière est déjà tout à fait corrompue or, l'élévation du coefficient D jusqu'au chiffre 5-6 est un indice de la corruption de la viande à son début. Vu la simplicité de ce procédé d'examen, il mérite d'être appliqué sur une large échelle.

1) I. A. Smorodintzew, Biochem. Z., 267, 18, 1933.

LA DETERMINATION DE LA CONDUCTIBILITÉ ELECTRIQUE ET DE LA TENSION SUPERFICIELLE DES EXTRAITS DE VIANDE EN TANT QUE PROCÉDÉ D'APPRECIATION DE LA QUALITÉ DE CELLE-CI.

Par

I. A. SMORODINTSEV ET N. N. KRYLOVA.

(Travail de l'Institut de l'industrie de la viande de Moscou.)

(Reçu pour la publication, le 2 avril 1936)

TECHNIQUE DE L'EXAMEN DE LA VIANDE.

On prend les deux quarts de la partie arrière d'un animal sain, pas trop gras, dont un est conservé à la température de 4° et l'autre à la température de 34°, on en découpe. A des intervalles déterminés, en vue de l'analyse, on débarrasse les morceaux de la graisse et du tissue conjonctif, puis on les hache finement par un hachoir, on y ajoute de l'eau dans la proportion de 1:4 et on agite le mélange dans un agitateur électrique pendant une heure. La conductibilité électrique du filtrat ainsi obtenu est alors déterminée par le procédé de Kohlrausch et la tension superficielle à l'aide de l'appareil de Rebinder.

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES.

A la suite de plusieurs séries d'examens conduits dans les mêmes conditions, nous sommes convaincus que la conductibilité électrique des extraits de viande conservés à la température de 4° augmente, au bout de 12-24 heures, de 8 à 13% comparativement à la première heure et reste à ce niveau pendant 18 jours. Dans les cas où la viande est conservée à la température de 34°, la conductibilité augmente, pendant les premières 24 heures, de 8 à 10% pour s'élever encore le deuxième ou le troisième jour, de 25 à 40%, comparativement à la première heure.

Les observations sur les variations de la tension superficielle

des extraits de viande ont abouti à des constatations diamétralement opposées. Dans les extraits de viande conservés à la température de 4° , la tension superficielle reste presque au même niveau pendant 5 jours et diminue du 10° au 18° jour de 5 à 7% comparativement à la première heure.

Quand la viande conservée à 34° commence à se corrompre on constate au bout de 28 à 72 heures une diminution de la tension superficielle de 12 à 30%.

Cette élévation brusque de la conductibilité électrique et l'abaissement de la tension superficielle peuvent être considérés comme des signes objectifs de corruption commengante de la viande.

Tableau illustrant ces modifications.

Heures Facteurs	1	12	24	48	72	120	240	360	432
$\kappa \cdot 10^5 + 4^{\circ}$	22.35	24.83	25.61	26.19	24.02	26.28	25.94	26.28	27.25
$\kappa \cdot 10^5 + 34^{\circ}$	24.05	25.09	25.96	34.89	29.12	—	—	—	—
$\sigma + 4^{\circ}$	71.05	68.57	70.36	71.80	71.85	70.72	64.64	66.28	64.41
$\sigma + 34^{\circ}$	70.48	70.10	68.66	49.93	49.41	—	—	—	—

L'augmentation de la conductibilité des extraits est liée à l'accumulation des substances à molécules peu complexes et à la libération des électrolytes de leurs combinaisons avec les substances protéiques, alors que la diminution de la tension superficielle indique que dans le processus d'autolyses du tissu, il y a dégagement d'acides gras volatiles ainsi que d'autres substances à tension superficielle active.

Nous avons l'intention dans la suite de faire ces recherches sur une large échelle pour en tirer les valeurs moyennes de ces indices pouvant être utilisés dans la détermination de la qualité de la viande par les procédés de laboratoire.

STUDIES ON TYROSINASE.

II. The action of the potato tyrosinase on various phenolic substances and the effect of addition of various amino compounds on that tyrosinase system.

(Directed by Assist. Prof. Dr. T. Uchino)

By

FUJIO NOBUTANI.

*From the Institute of Medical Chemistry (Director: Prof. Dr. K. Kodama)
and the Department of gynecology and Obstetrics (Director: Prof. Dr.
M. Shiraki) Kyushu Imperial University, Fukuoka.*

(Received for publication, April 21, 1936)

INTRODUCTION.

That the enzyme tyrosinase can oxidise certain phenolic substances besides tyrosine, producing coloured substances, is widely known. *p*-cresol is thus readily oxidised by this enzyme with the production of orange-coloured substances. Chodat (1912) found that if certain amino acids such as glycine or alanine were added to *p*-cresol and tyrosinase, beautiful fluorescent cresol blue dye was produced. Several years ago Okuyama (1929) observed in our laboratory that *p*-cresol and other phenols give a high reduction potential with tyrosinase in the presence of glycine. As regards the exact nature of the chemical changes involved in this reaction, it was shown by Pugh and Raper (1927) that the first attack of tyrosinase on monohydric phenols is the introduction of a hydroxyl group in the *o*-position to the one already present, thus producing a catechol derivative, and then oxidation of this to the corresponding *o*-quinone. Further changes of *o*-quinone into various coloured substances are said to take place without the action of tyrosinase. It was found by Robinson and McCance (1925) that *p*-cresol and catechol show an absorption per molecule of one atom of oxygen more than that corresponding to the formation of *o*-quinone. As to the nature of the action of glycine, Okuyama suggests that

amino acid may combine with the oxydation product of phenolic substances under the liberation of active hydrogen. Pugh and Raper were able to show that, when tyrosinase acted on several phenols in the presence of aniline, anilino compounds of the ortho-quinones were produced.

It is generally believed that the enzyme action depends upon a combination of the enzyme molecule and substrate, followed by a breaking down in different ways to regenerate the enzyme and the end-products of enzymatic decomposition. It is therefore probable that the chemical structure of the substrates, especially chemical groupings of different nature contained in the substrate molecules would play an important rôle in the chemical reactions catalysed by enzyme.

In the present work the action of tyrosinase on a large number of phenolic substances and the effect thereon of the addition of various amino compounds were studied. The action of tyrosinase was examined in two ways: (a) by the comparison of colour changes of phenol solutions by tyrosinase action and (b) by measuring the oxygen up-take using Warburg's microrespirometer. The object of these experiments is to find if there is any relation between the enzyme action and the chemical constitution of the substrates and to study the influence of the addition of different kinds of amino compounds on the tyrosinase action.

Preparation of the enzyme.

The tyrosinase was obtained from potato peelings by precipitation with alcohol as described by Chodat (1925). The enzyme preparation thus obtained was dark brown coloured powder, readily soluble in water. It is free from peroxydase and gives very weak ninhydrine and Millon's reaction. The biuret and Liebermann's phenol reaction are both negative.

From this powder 0.25 per cent aqueous solution was prepared, if necessary filtered, and kept in the ice-chest with toluene for use. In this state the activity of the ferment remained unchanged for about a month.

A. EXPERIMENTS ON THE COLOUR CHANGE OF PHENOL SOLUTIONS
BY TYROSINASE ACTION.

I. Action of tyrosinase on *p*-cresol at various pH.

The action of tyrosinase on *p*-cresol was examined at various pH in order to find the optimum pH for the production of pigmented substances. The method of experiment was as follows. To 1 cc. *M*/90 *p*-cresol solution in test tubes were added 1 cc. *M*/5 phosphate buffer (pH 5.58, 6.46, 7.38 and 8.04) and 1 cc. distilled water. Then 1 cc. of tyrosinase solution was added and the mixture allowed to stand in a water bath, maintained at the temperature of 25°. Comparison was made of colour changes occurring in the solutions at intervals during a period of 24 hours. The results are shown in Table I. The intensity of the colour development was denoted by the number of positive signs.

TABLE I.

Action of tyrosinase on *p*-cresol at various pH.

1 cc. *M*/90 *p*-cresol+1 cc. *M*/5 phosphate buffer+1 cc. distilled water+1 cc. tyrosinase solution.

Temp.=25° a) Colour of the upper layer.

b) Colour of the lower layer.

Time pH	10'	20'	30'	1 ^h	7 ^h	24 ^h
5.58	Nil	Pale yellow ±	Yellow +	Yellow orange +	Orange brown ++	Orange brown ++
6.46	Nil	Yellow +	Yellow orange +	a) Brown ++ b) Yellow orange +	Orange brown ++	Brown +++
7.38	Yellow +	Yellow orange ++	Orange brown +++	a) Brown +++ b) Orange brown ++	Brown ++++	Brown +++++
8.04	Yellow +	Yellow orange ++	a) Brown +++ b) Yellow orange ++	a) Brown +++ b) Yellow orange ±	a) Brown +++ b) Yellow orange ±	Brown ++++

It will be seen from Table I, that the optimum pH for the action of tyrosinase lies in the vicinity of pH 7.38.

II. Action of tyrosinase on various phenolic substances.

In this section the action of tyrosinase on a number of phenolic substances was investigated. The following substances were used as substrates: phenol, *o*-, *m*- and *p*-cresol, catechol, resorcinol, quinol, *o*-, *m*- and *p*-nitrophenol, *m*- and *p*-aminophenol, *o*-, *m*- and *p*-hydroxybenzoic acid, *o*-, *m*- and *p*-chlorophenol, tyrosine and dihydroxyphenylalanine. Of all these substances *M*/90 solutions were prepared, and the experiment was carried out in the same manner as mentioned in the foregoing section at pH 7.38 and at 25°. The results are recorded in Table II.

The results in Table II show:

1. Among three isomers of cresol *p*-cresol was most rapidly

TABLE II.

Action of tyrosinase on various phenolic substances.

1 cc. *M*/90 substrate solution + 1 cc. *M*/5 phosphate buffer + 1 cc. distilled water + 1 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25° pH = 7.38 a) Colour of the upper layer.

b) Colour of the lower layer.

Substrate used \ Time	Time for colour development	10'	30'	1 ^h	2 ^h	24 ^h
Phenol	1 ^h 10'	Nil	Nil	Nil	Rosa ++	Dark brown +++
<i>o</i> -Cresol	24 ^h	Nil	Nil	Nil	Nil	Orange ±
<i>m</i> -Cresol	20'	Yellow ±	Orange ++	Reddish brown ++	a) Brown +++ b) Reddish brown ++	Brown +++
<i>p</i> -Cresol	10'	Yellow +	Brownish orange +++	a) Brown +++ a) Brownish orange ++	a) Brown +++ b) Brownish orange ++	Brown +++

			a) Dark green +++ b) Dark orange +	a) Dark green +++ b) Dark orange +	a) Dark green +++ b) Dark orange +	Dark green +++
Catechol	1'	Greenish yellow ++				
Resorcinol	> 24 ^h	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
Quinol	3 ^h	Nil	Nil	Nil	Nil	Reddish orange ++
<i>o</i> -Nitro-phenol	> 24 ^h	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
<i>m</i> -Nitro-phenol	> 24 ^h	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
<i>p</i> -Nitro-phenol	> 24 ^h	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
<i>m</i> -Amino-phenol	> 24 ^h	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
<i>p</i> -Amino-phenol	1'	Brown ++	Brown ++	Brown ++	Brown ++	Brown + (Brown ppt.)
<i>o</i> -Hydroxy-benzoic acid	> 24 ^h	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
<i>m</i> -Hydroxy-benzoic acid	> 24 ^h	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
<i>p</i> -Hydroxy-benzoic acid	> 24 ^h	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
<i>o</i> -Chlor-phenol	4 ^h	Nil	Nil	Nil	Nil	Brown +
<i>m</i> -Chlor-phenol	2½ ^h	Nil	Nil	Nil	Nil	Brown +
<i>p</i> -Chlor-phenol	50'	Nil	Nil	Orange ±	Orange ++	Brown ++
Tyrosine	1½ ^h	Nil	Nil	Nil	Rosa ±	Dark violet +++
Dihydroxy-phenyl-alanine	1'	Reddish brown +	a) Dark brown ++ b) Reddish brown +	a) Dark brown ++ b) Reddish brown ±	a) Brownish violet ++ b) Reddish brown ±	Dark brown + (Black ppt.)

and strongly attacked by tyrosinase and caused the deep brownish orange colouration of the solution. *m*-cresol was acted upon to the lesser extent and gave weaker colour than *p*-cresol, while *o*-cresol was found to produce almost no colour.

2. Catechol caused rapid colouration immediately after the addition of tyrosinase, while quinol was attacked by tyrosinase very slowly. In the case of resorcinol no colouration was to be noticed.

3. *o*-, *m*- and *p*-nitrophenols produced no coloured substances within 24 hours. The same was observed of *o*-, *m*- and *p*-hydroxybenzoic acids.

4. No colour development was observed in the solution of *m*-aminophenol, whilst *p*-aminophenol showed deep brown colour in the presence of tyrosinase. Inasmuch as *p*-aminophenol solution undergoes spontaneous darkening on staying in the air, a control experiment was made without the addition of tyrosinase and the latter gave weaker colour than the former.

5. *o*- and *m*-chlorphenol were found to produce very weak colour after 24 hours, while *p*-chlorphenol showed colour development after an hour.

6. Dihydroxyphenylalanine produced immediately after the addition of tyrosinase, strongly coloured substances, which turned to black precipitates after 24 hours, whilst tyrosine gave this pigmented substances only after a latent period of about 1½ hours.

From the results described here it will be seen that those phenols which are likely to give *o*-quinones on oxidation produce pigmented substances.

III. Action of tyrosinase on several phenols in the presence of glycine.

a) The experiment was carried out at various pH and the optimum pH for the action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of glycine was examined. The experimental method was the same as mentioned in the former sections. In place of distilled water 1 cc. *M*/30 glycine was added and the observation was made of the colour changes in the mixture at 25°. The results are shown in Table III.

TABLE III.

Action of tyrosinase on *p*-cresol at various pH in the presence of glycine.
1 cc. *M*/90 *p*-cresol + 1 cc. *M*/5 phosphate buffer + 1 cc. *M*/30 glycine + 1 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25° a) Colour of the upper layer.

b) Colour of the lower layer.

Time pH	10'	20'	30'	1 ^h	7 ^h	24 ^h
5.58	Yellow +	Yellowish orange +	a) Brownish orange ++ b) Yellowish orange +	a) Brownish orange ++ b) Yellowish orange +	a) Reddish orange ++ b) Yellowish orange ±	a) Reddish orange ++ b) Yellowish orange ++
6.46	Reddish orange +	Reddish orange ++	a) Red + b) Reddish orange ++	a) Red + b) Reddish orange ++	a) Orange red ++ b) Rosa +	Brownish red ++
7.38	Red +++	a) Red +++ b) Red ++	a) Reddish violet +++ b) Red ++	a) Reddish violet +++ b) Red ±	a) Reddish violet +++ b) Blue +	Reddish violet +++
8.04	Red ++	a) Red +++ b) Red +	a) Red +++ b) Red +	a) Red +++ b) Red ±	a) Reddish violet +++ b) Blue +	Reddish violet +++

From Table III it is clear that the optimum pH lies at pH 7.38 and is not affected by the addition of glycine. It must be however noted that the presence of glycine markedly promotes the production of pigments.

b) We have then studied the effect of glycine on the colour development of the solution containing several phenolic substances and tyrosinase. *p*-cresol, *m*-cresol and catechol were used as substrate and glycine was added in varying amounts as follows. To 1 cc. *M*/90 *p*-cresol, *m*-cresol or catechol solution were added 1 cc. *M*/5 phosphate buffer (pH 7.38) and 1 cc. *M*/30, *M*/60 or *M*/90 glycine, then 1 cc. tyrosinase solution was added and the colour

changes in the mixtures were examined at 25°. The results are shown in Table IV.

TABLE IV.

Action of tryrosinase on several phenols in the presence of varying amounts of glycine.

1 cc. *M*/90 *p*-cresol, *m*-cresol or catechol + 1 cc. *M*/5 phosphate buffer + 1 cc.

M/30, *M*/60 or *M*/90 glycine + 1 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25° pH = 7.38 a) Colour of the upper layer.

b) Colour of the lower layer.

Substrate used	Time	Concentration of the glycine solution	Time for colour development	10'	1 ^h	18 ^h	24 ^h
<i>M</i> /90 <i>p</i> -Cresol		<i>M</i> /30	6' (Red)	Red +++	a) Reddish violet +++ b) Red ±	Reddish violet +++	Reddish violet +++
		<i>M</i> /60	6' (Yellowish orange)	Red ++	Red ++	Red +++	Red +++
		<i>M</i> /90	6' (Orange)	Red ++	Red ++	Red ++	red ++
		0	10' (Yellow)	Yellow +	a) Brown +++ b) Orange brown ++	Brown +++	Brown +++
<i>M</i> /90 <i>m</i> -Cresol		<i>M</i> /30	10' (Rosa)	Rosa +	Red +++	Reddish violet ++	Brownish red ++
		<i>M</i> /60	15' (Rosa)	Rosa ±	Red ++	Red ++	Brownish red ++
		<i>M</i> /90	15' (Rosa)	Nil	Red ++	a) Red +++ b) Violet +	Brownish red +
		0	20' (Yellow)	Yellow ±	Reddish brown ++	Brown +++	Brown +++

M/90 Catechol	M/30	1' (Red)	a) Red +++ b) Red ++	a) Reddish brown +++ b) Red ±	a) Reddish brown +++ b) Violet +	Dark brown +++
	M/60	1' (Reddish brown)	Reddish brown ++	Reddish brown ++	Brownish red +++	Dark brown +++
	M/90	1' (Brown)	Reddish brown ++	Reddish brown ++	Brown ++	Dark brown ++
	0	1' (Greenish yellow)	Greenish yellow ++	a) Dark green +++ b) Dark orange +	a) Dark green +++ b) Dark orange +	Dark green +++

It will be seen from Table IV that if glycine was added to the system phenol-tyrosinase the production of pigments from phenolic substances was markedly accelerated, the rate and the intensity of colour development being proportional to the amounts of glycine added to the system.

IV. The action of tyrosinase on various phenolic substances in the presence of glycine.

The action of tyrosinase on a number of phenolic substances in the presence of glycine was examined. The method of experiments was the same as mentioned in experiment II. 1 cc. M/30 glycine was used in place of distilled water. The results are recorded in Table V.

It is clear from the Table V, that the rate of colour development with tyrosinase was markedly accelerated in the presence of glycine.

V. The influence of various amino acids on the p-cresol-tyrosinase system.

a) In this experiment *p*-cresol was used as substrate and an attempt was made to compare the promoting action of various

TABLE V.

Action of tyrosinase on various phenolic substances in the presence of glycine.

1 cc. *M*/90 substrates + 1 cc. *M*/5 phosphate buffer + 1 cc. *M*/30 glycine + 1 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25° pH = 7.88 a) Colour of the upper layer.

b) Colour of the lower layer.

Substrate used	Time for colour development	10'	30'	1 ^b	2 ^b	24 ^b
Phenol	1 ^b	Nil	Nil	Rosa +	Rosa +	Dark reddish brown +++
<i>o</i> -Cresol	24 ^b	Nil	Nil	Nil	Nil	Rosa ±
<i>m</i> -Cresol	10'	Red +	Red +++	Red +++	a) Red +++ b) Red ++	Brownish red ++
<i>p</i> -Cresol	6'	Rosa +++	a) Red +++ b) Red ++	a) Reddish violet +++ b) Red ±	a) Reddish violet +++ b) Blue ±	Reddish violet +++
Catechol	1'	a) Red +++ b) Red ++	a) Reddish brown +++ b) Red ++	a) Reddish brown +++ b) Red ±	a) Reddish brown +++ b) Violet +	Dark brown +++
Resorcinol	>24 ^b	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
Quinol	1 ^b	Nil	Rosa ±	Rosa +	Rosa +	Reddish brown ++
<i>o</i> -Nitrophenol	>24 ^b	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
<i>m</i> -Nitrophenol	>24 ^b	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
<i>p</i> -Nitrophenol	>24 ^b	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil

<i>m</i> -Amino-phenol	> 24 ^h	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
<i>p</i> -Amino-phenol	1'	Brown ++	Brown + (Brown ppt.)	Brown + (Brown ppt.)	Brown + (Brown ppt.)	Brown + (Brown ppt.)
<i>o</i> -Hydroxy-benzoic acid	> 24 ^h	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
<i>m</i> -Hydroxy-benzoic acid	> 24 ^h	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
<i>p</i> -Hydroxy-benzoic acid	> 24 ^h	Nil	Nil	Nil	Nil	Nil
<i>o</i> -Chlor-phenol	2 ^h	Nil	Nil	Nil	Rosa ±	Red ++
<i>m</i> -Chlor-phenol	1 ^h	Nil	Nil	Rosa ±	Rosa +	Red ++
<i>p</i> -Chlor-phenol	15'	Nil	Rosa +	Red +	Red ++	Reddish brown +++
Tyrosine	2 ^h	Nil	Nil	Nil	Rosa +	Dark violet ++
Di-hydroxy-phenyl-alanine	1'	Brownish red ++	a) Dark brown ++ b) Brownish red ++	a) Dark brown ++ b) Brownish red +	a) Brownish violet ++ b) Dark green +	Dark brown + (Black ppt.)

amino acids on the oxidation of *p*-cresol by tyrosinase. Table VI gives the results obtained.

1. Almost all amino acids hastened the formation of coloured substances from *p*-cresol. Among amino acids tried, glycine caused the most rapid and intense colour development. The cherry red colour which appeared at first changed gradually to brilliant blue colour with brownish fluorescence. The same was true of phenyl-

TABLE VI.

Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of various amino acids.
 1 cc. *M*/90 *p*-cresol + 1 cc. *M*/5 phosphate buffer + 1 cc. *M*/30 Amino acids + 1 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25° pH = 7.38 a) Colour of the upper layer.

b) Colour of the lower layer.

Substrate used	Time for colour development	10'	30'	1 ^h	3 ^h	24 ^h
Glycine	6' (Red)	Red +++	a) Red +++ b) Red ++	a) Reddish violet +++ b) Red ±	a) Reddish violet +++ b) Blue ±	Violet red +++
Cystine (<i>M</i> /60)	8' (Red)	Red ++	a) Red +++ b) Red +	a) Red +++ b) Blue ±	a) Greenish brown +++ b) Blue ±	Yellowish green ++
Phenyl-alanine	6' (Red)	Red ++	Red +++	Red +++	a) Reddish violet +++ b) Violet +	Blue ++++
Glutamic acid	6' (Red)	Red ++	Red +++	Red +++	Red +++	Red ++++
Asparagine	6' (Red)	Red +	Red ++	Red ++	a) Reddish violet ++ b) Reddish violet +	Reddish violet ++++
Leucine	6' (Red)	Red +	Red ++	Red ++	Red ++	Red ++
Tryptophan	6' (Red)	Red +	a) Red ++ b) Red +	a) Red ++ b) Red +	Brownish red +++	Dark brown +++
Alanine	6' (Red)	Red +	Red ++	Red ++	Red +++	Red ++++
Tyrosine	6' (Orange)	Orange +	a) Red ++ b) Red +	a) Red ++ b) Red +	a) Brownish red ++ b) Rosa +	Red +++

Glycine ethyl ester	6' (Orange)	Orange +	Red ++	Red +	Red +	Red ++
Glycyl-alanine anhydride	15' (Orange)	Orange ±	Orange ++	a) Orange brown ++ b) Orange +	a) Orange brown ++ b) Orange +	Orange brown ++
Hydroxyl-amine	2' (Red)	Rosa +	Orange +	Yellowish orange +	Yellowish orange +	Yellowish orange ++

alanine.

2. Slightly less rapid and deep red to reddish violet colour development was observed in the case of glutamic acid, asparagine, leucine and alanine.

3. Glycyl-alanine anhydride, glycine ethyl ester and tyrosine have no influence on the formation of coloured substances.

4. Hydroxylamine markedly accelerates the rate of colour development. The further deepening of the colour, however, takes place very slowly.

b) In this experiment the hydroxylamine was added in varying amounts to *p*-cresol and tyrosinase, and its effect on this system more thoroughly examined.

The result in Table VII shows that at higher concentrations of hydroxyl-amine the colour appeared earlier, its further depending, however, was more or less depressed, while at lower concentrations more intense colour changes were observed on prolonged action of tyrosinase.

B. MEASUREMENT OF OXYGEN ABSORPTION.

In order to elucidate the results obtained in the foregoing sections more thoroughly, the following series of experiments on the oxygen up-take of the phenol-tyrosinase system were undertaken.

Experimental procedure.

The oxygen up-take was measured in Warburg's microrespirometer using the vessel of about 20 cc. capacity with a cylindri-

TABLE VII.

Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of
varying amounts of hydroxylamine.

1 cc. *M*/90 *p*-cresol + 1 cc. *M*/5 phosphate buffer + 1 cc. *M*/30 hydroxylamine
+ 1 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25° pH = 7.38 a) Colour of the upper layer.

b) Colour of the lower layer.

Con- cent- ration of the hydroxyl- amine solution	Time	Time for colour develop- ment	10'	30'	1 ^h	2 ^h	24 ^h
<i>M</i> /30		2' (Red)	Rosa +	Orange +	Yellowish orange +	Yellowish orange +	Yellowish orange ++
<i>M</i> /90		3' (Red)	Rosa +	Rosa orange ++	Rosa orange +	a) Rosa orange + b) Yellowish orange ±	Orange brown ++
<i>M</i> /180		3' (Rosa)	Rosa ++	Red ++	Orange red ++	Orange red ++	Orange red +++
<i>M</i> /270		3' (Rosa)	Red +++	Red +++	Orange red ++	Orange red ++	Orange red +++
<i>M</i> /360		3' (Rosa)	Red ++	Red ++	Orange red ++	Orange red ++	Orange red +++

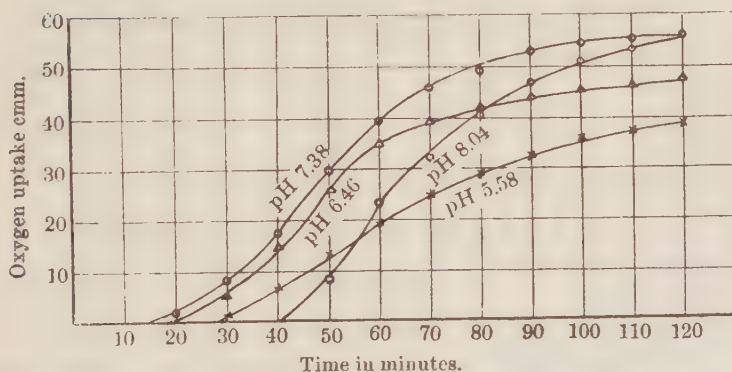
cal compartment in the center and with a side chamber which serves as a reservoir for tyrosinase solution. By turning this side chamber the enzyme solution can be poured into the main compartment. Into the central compartment 0.5 cc. 10% KOH was pipetted in order to absorb the carbon dioxide produced. 0.5 cc. *M* 300 substrate solution, 0.5 cc. distilled water or amino acids solution and 4.0 cc. *M*/15 phosphate buffer solution were introduced into the main chamber of the vessel, then 0.5 cc. tyrosinase solution

was pipetted into the side chamber. Thus the total volume of the solution introduced into the vessel was always 6.0 cc. The air in the vessel was replaced by oxygen. Throughout the experiment the temperature of the thermostat was adjusted at 25°. The apparatus was shaken as usual and after the equilibration of the pressure was attained the tyrosinase solution was introduced into the main compartment from the side chamber and the manometer readings were taken at the intervals of 10 minutes. Under this experimental condition 18.63 cmm (0°, 760 mm Hg) oxygen correspond to one atom of oxygen per molecule of substrate.

I. Optimum pH for the action of tyrosinase on *p*-cresol.

In order to find out the optimum pH for oxygen consumption the experiment was carried out at various pH using *M*/15 phosphate buffer (pH. 5.58, 6.46, 7.38, and 8.04) and the result as shown in Fig. 1 was obtained.

Fig. 1. Action of tyrosinase on *p*-cresol at various pH.
0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 4.0 cc. *M*/15 phosphate buffer
+ 0.5 cc. distilled water + 0.5 cc. tyrosinase solution.
Temp. = 25° pH = 5.58, 6.46, 7.38, and 8.04.



1. It is clearly seen from the Fig. 1, that the optimum pH of oxygen consumption of *p*-cresol-tyrosinase system lies at pH 7.38. Further-more it was confirmed that 3 atoms of oxygen were absorbed by 1 molecule of *p*-cresol within 120 minutes.

2. On the acid side of the optimum pH the oxygen was consumed more slowly. Within 120 minutes only 2 atoms of oxygen were taken up.

3. On the alkaline side the oxygen consumption occurs at first very slowly, later more and more rapidly and at the end of 120 minutes, 3 atoms of oxygen were consumed.

II. Action of tyrosinase on various phenolic substances.

a) In this experiment the following substances were employed as substrate: *o*-, *m*- and *p*-cresol, phenol, catechol, quinol, resorcinol, *o*-, *m*- and *p*-hydroxybenzoic acid, *p*- and *m*-aminophenol, tyrosine, dihydroxyphenylalanine, *o*-, *m*- and *p*-chlorphenol, α -naphthol, β -naphthol and *p*-benzoquinone. The results are shown in Fig. 2, 3 and Table VIII.

TABLE VIII.

Action of tyrosinase on various phenolic substances.

0.5 cc. *M*/300 substrate solution + 4 cc. *M*/15 phosphate buffer + 0.5 cc.

distilled water + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25 pH = 7.38

Substrate	O ₂ uptake after 120 minutes. cmm (0°, 760 mm Hg)	O ₂ uptake after 120 minutes. (Atoms per molecule of substrate)
<i>o</i> -Cresol	0	0
<i>m</i> -Cresol	8.19	0.43
<i>p</i> -Cresol	56.0	3.0
Catechol	35.7	2.0
Resorcinol	0	0
Quinol	9.75	0.51
Phenol	0	0
Tyrosine	0	0
Dihydroxyphenylalanine	43.47	2.3
<i>p</i> -Aminophenol	14.0	0.75
<i>m</i> -Aminophenol	0	0
<i>o</i> -Hydroxybenzoic acid	0	0
<i>m</i> -Hydroxybenzoic acid	0	0
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0	0
<i>o</i> -Chlorphenol	0	0
<i>m</i> -Chlorphenol	0	0
<i>p</i> -Chlorphenol	0	0
α -Naphthol	0	0
β -Naphthol	0	0
Benzoquinone	0	0

Fig. 2. Action of tyrosinase on various phenolic substances.
 0.5 cc. $M/300$ substrate solution + 4.0 cc. $M/15$ phosphate buffer
 + 0.5 cc. distilled water + 0.5 cc. tyrosinase solution.
 Temp. = 25° pH = 7.38.

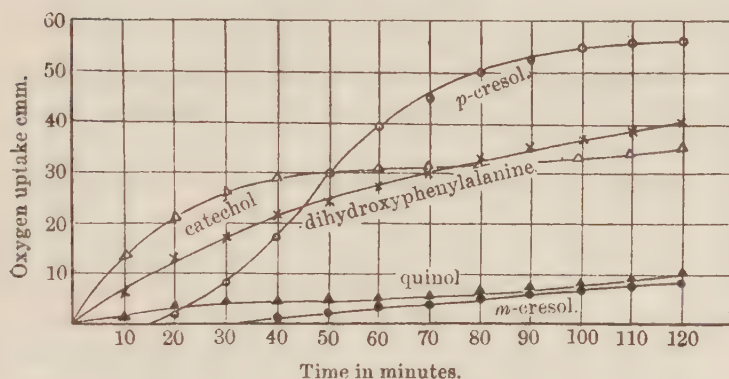
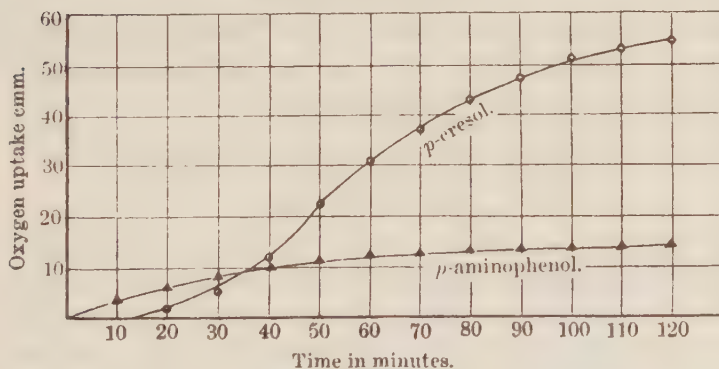


Fig. 3. Action of tyrosinase on *p*-aminophenol.
 0.5 cc. $M/300$ *p*-aminophenol + 4.0 cc. $M/15$ phosphate buffer
 + 0.5 cc. distilled water + 0.5 cc. tyrosinase solution.
 Temp. = 25° pH = 7.38.



1. It will be seen that the rate and extent of oxygen uptake were found to vary markedly from substrate to substrate. Whilst *p*-cresol absorbs 3 atoms of oxygen, catechol takes up only 2 atoms upon oxydation. In these cases the oxygen consumption is one atom more than that corresponding to the formation of *o*-quinone. This fact was already pointed out by Robinson and McCance

(1925). It is however to be noted, that in the case of *p*-cresol the oxygen was consumed at first very slowly, later after a lapse of latent period with greater rapidity, indicating that the reaction is autocatalytic in nature. When catechol was used as substrate, no such initial lag of oxygen uptake was observed.

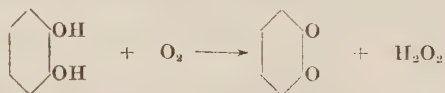
2. The oxygen uptake of *m*-cresol was very small in comparison with that of *p*-cresol, while *o*-cresol shows no oxygen absorption within 120 minutes.

3. Quinol and *p*-aminophenol show a low oxygen consumption.

4. Tyrosinase has no action on *o*-, *m*- and *p*-hydroxybenzoic acid, *o*-, *m*- and *p*-chlorphenol, phenol, resorcinol, α - and β -naphthol, *m*-aminophenol and *p*-benzoquinone within 120 minutes.

5. In the case of tyrosine no oxygen was consumed within 120 minutes, while dihydroxyphenylalanine shows marked oxygen uptake immediately after the tyrosinase was added.

b) In the above experiments the oxygen absorption of *p*-cresol and catechol per molecule was found to be one atom more than that corresponding to the formation of *o*-quinone. This excess oxygen uptake might be accounted for by the formation of hydrogen peroxide in the reaction between catechol and oxygen, in which oxygen is acting as a hydrogen acceptor.

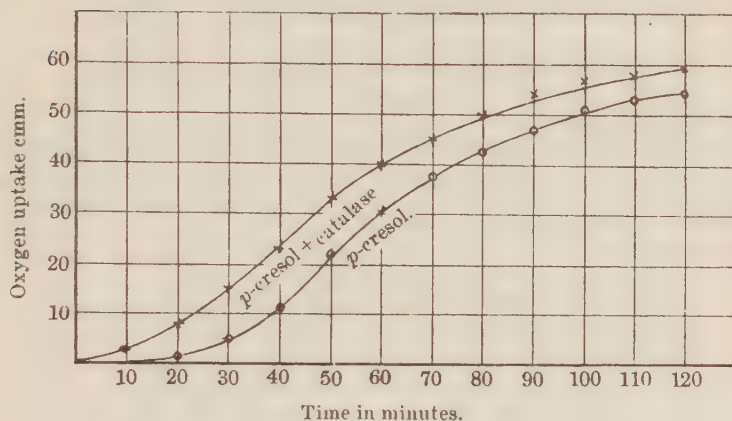


If hydrogen peroxide is produced, it will be broken down by catalase into water and oxygen with consequent decrease in oxygen uptake of the tyrosinase system. Therefore in the following experiment the oxygen consumption was measured in the presence of catalase. (I wish here to express my thanks to Mr. R. Itoh, who kindly furnished his purified catalase preparation for my use.)

From Fig. 4 it is clear that in the presence of catalase no decrease of oxygen consumption takes place. It is evident that hydrogen peroxide is not produced in the reaction between *p*-cresol and tyrosinase.

c) In order to decide whether the reaction of tyrosinase on

Fig. 4. Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of catalase.
 0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 4.0 cc. *M*/15 phosphate buffer + 0.5 cc.
 catalase solution + 0.5 cc. tyrosinase solution.
 Temp. = 25° pH = 7.38.



monohydric phenols is really autocatalytic in nature or not, we examined the oxygen absorption of *p*-cresol and tyrosinase in the presence of a minute amount of catechol. Fig. 5 gives the results obtained.

Fig. 5. Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of catechol.
 0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 4.0 cc. *M*/15 phosphate buffer + 0.5 cc.
M/30000 catechol + 0.5 cc. tyrosinase solution.
 Temp. = 25° pH = 7.38.

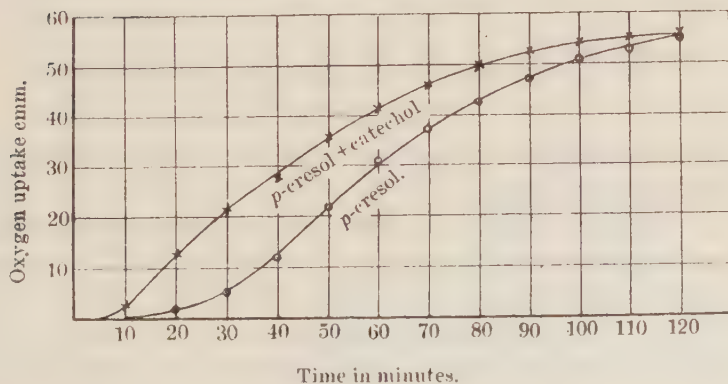


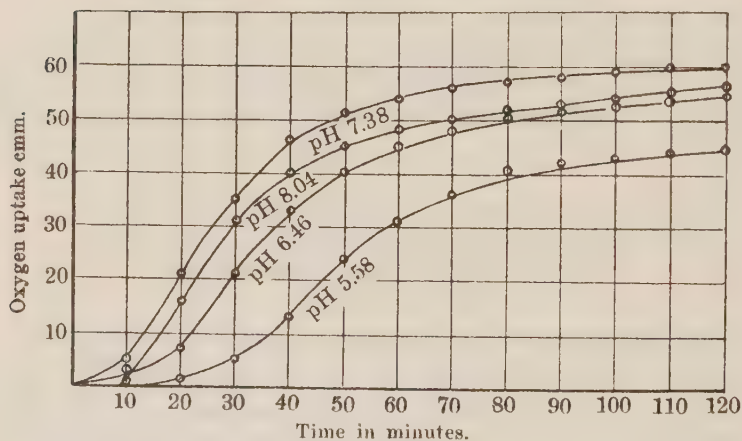
Fig. 5 shows clearly that the addition of catechol to *p*-cresol causes the elimination of the initial lag of oxygen uptake. It thus appears likely that some intermediate product formed in the reaction accelerates autocatalytically the oxidation of *p*-cresol.

III. Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of glycine.

a) We examined at first the optimum pH for oxygen uptake of the *p*-cresol-tyrosinase system, in the presence of glycine, using phosphate buffers pH 5.58, 6.46, 7.38, and 8.04. The results are shown in Fig. 6.

Fig. 6. Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of glycine at various pH.

0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 4.0 cc. *M*/15 phosphate buffer
+ 0.5 cc. *M*/100 glycine + 0.5 cc. tyrosinase solution.
Temp. = 25° pH = 5.58, 6.46, 7.38 and 8.04.



The optimum pH was not affected by the addition of glycine and remained at pH 7.38.

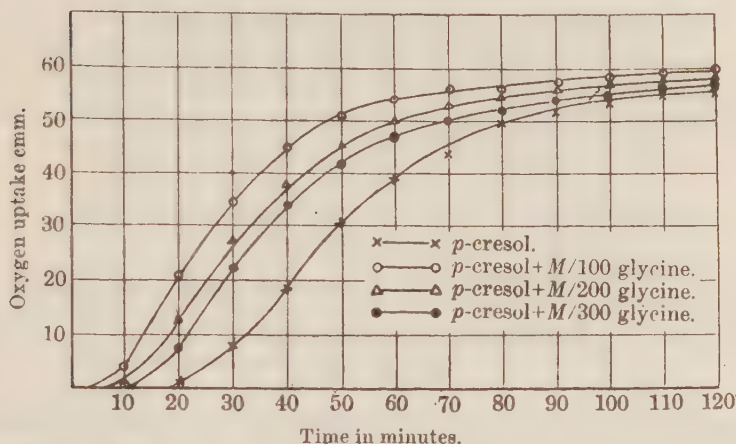
b) We then studied the effect of the addition of varying amounts of glycine at this optimum pH and the result, as shown in Fig. 7, was obtained.

The rate of oxygen absorption was markedly accelerated in the presence of glycine, the degree of acceleration being proportional

Fig. 7. Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of various amount glycine.

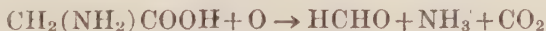
0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 4.0 cc. phosphate buffer + 0.5 cc. *M*/300, *M*/200 or *M*/100 glycine + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25° pH = 7.38.



to the amounts of glycine added. The total amount of oxygen taken up by the system, however, was not in any way augmented by the addition of glycine.

Robinson and McCance (1925) stated that glycine was readily oxidised in the presence of *p*-cresol and tyrosinase and that the amount of oxygen taken up in excess of that absorbed by *p*-cresol alone was approximately that theoretically required for the following equation.

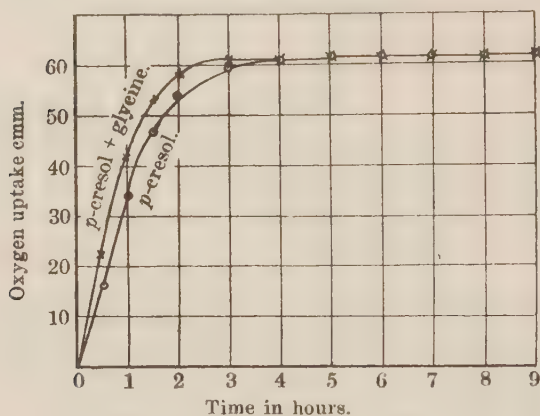


In my experiment the oxygen uptake in excess which was ascribed to glycine by these authors was not observed, even when the reaction time was extended for 9 hours as shown in Fig. 8. This was the same when the buffer of pH 8.04 was used.

IV. The action of tyrosinase on various phenolic substances in the presence of glycine.

Various phenolic substances as described in Experiment II

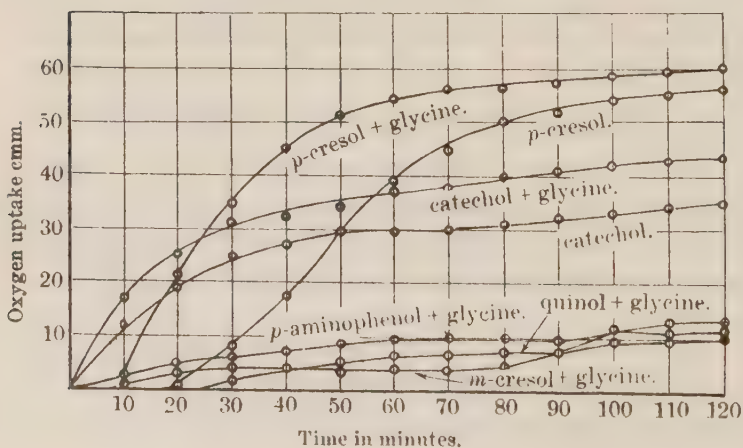
Fig. 8. Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of glycine.
 0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 4.0 cc. *M*/15 phosphate buffer,
 + 0.5 cc. *M*/100 glycine + 0.5 cc. tyrosinase solution.
 Temp. = 25° pH = 7.38.



were used as substrates and the oxygen uptake of these substances in the presence of tyrosinase and glycine was compared. The results are shown in Fig. 9.

Fig. 9. Action of tyrosinase on various phenolic substances in the presence of glycine.

0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 4.0 cc. *M*/15 phosphate buffer
 + 0.5 cc. *M*/100 glycine + 0.5 cc. tyrosinase solution.
 Temp. = 25° pH = 7.38.



1. In the presence of glycine, catechol does not show so marked increase in the rate of oxygen absorption as in the case of *p*-cresol. It is noteworthy that glycine does not affect in any way the total amount of oxygen absorbed by the system.

2. In the case of quinol, *m*-cresol and *p*-aminophenol the oxygen uptake was not accelerated by the addition of glycine.

3. Phenol, resorcinol *o*-, *m*- and *p*-hydroxybenzoic acid, *o*-, *m*- and *p*-chlorphenol and *o*-cresol were not attacked by tyrosinase within 120 minutes even in the presence of glycine.

V. *Effect of various amino acids on the oxygen uptake of the p-cresol-tyrosinase system.*

In this experiment only *p*-cresol was employed as substrate and the influence of various amino acids on the oxygen consumption of *p*-cresol and tyrosinase was compared. Fig. 10, 11 and 12 give the results obtained.

1. Fig. 10, 11 and 12 indicate that all the amino acids (alanine excepted) accelerate the rate of oxygen uptake to about the same

Fig. 10. Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of various amino acids.

0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 4.0 cc. *M*/15 phosphate buffer + 0.5 cc. *M*/100 amino acid + 0.5 cc. tyrosinase solution.
Temp. = 25° pH = 7.38.

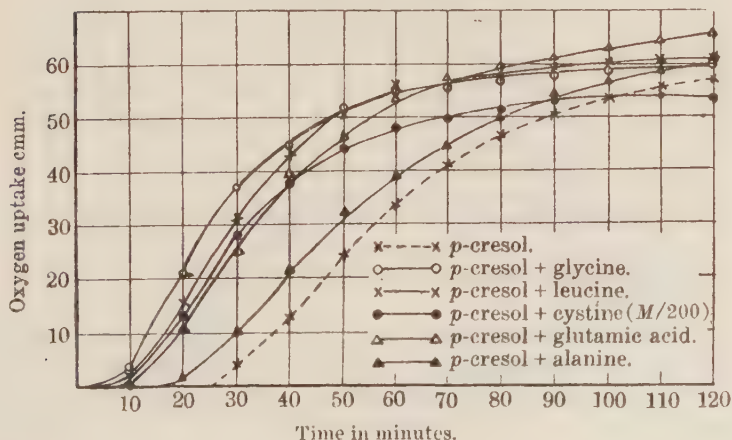


Fig. 11. Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of various amino acids.

0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 4.0 cc. *M*/15 phosphate buffer + 0.5 cc. *M*/100 amino acid + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25° pH = 7.38.

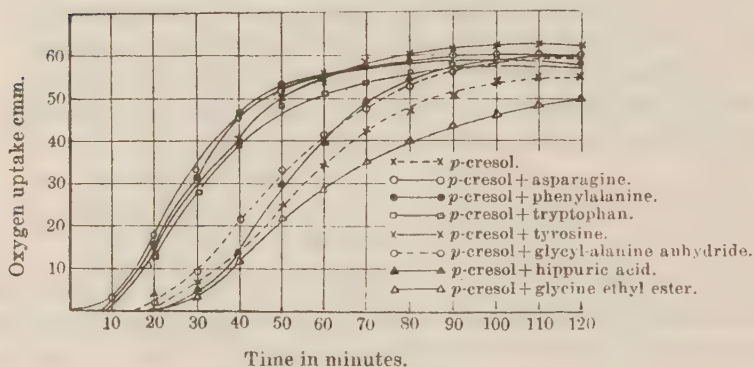
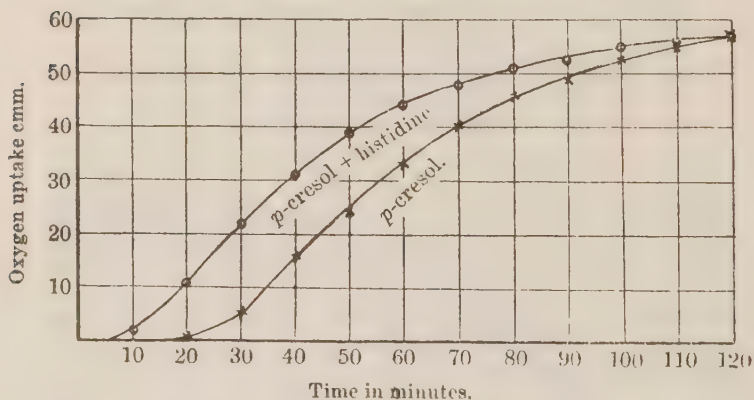


Fig. 12. Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of histidin.

0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 4.0 cc. *M*/15 phosphate buffer + 0.5 cc. *M*/100 histidine + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25° pH = 7.38.



extent as glycine.

2. Alanine, hippuric acid, glycyl-alanine anhydride showed very weak promoting effect.

3. Glycine ethyl ester caused rather diminution of oxygen absorption.

VI. Effect of various amino compounds on the oxygen uptake of the *p*-cresol-tyrosinase system.

Further experiments were carried out in order to examine the relative effect of various aliphatic and aromatic amino compounds on the reaction between *p*-cresol and tyrosinase.

a) We studied at first the effect of the addition of various aliphatic amines, such as monomethylamine, dimethylamine, trimethylamine, ethylamine, propylamine, histamine and taurine. The results obtained are shown in Fig. 13 and 14.

1. While the effect on the oxygen uptake due to various primary and tertiary amines is quite insignificant, dimethylamine seems to promote the oxygen consumption to some extent. The control experiment shows us however that dimethylamine alone with tyrosinase consumes oxygen to about the same extent as is accelerated in the presence of this amine.

2. Taurine accelerates the oxygen absorption to about the same extent as amino acids.

b) The effect of aromatic amines such as aniline, *o*-, *m*- and *p*-toluidine, *o*-, *m*- and *p*-aminobenzoic acid, sulphanilic acid, acetanilide, *m*- and *p*-phenyldiamine, α -naphthylamine and phenyl-

Fig. 13. Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of aliphatic amines.

0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 4.00 cc. *M*/15 phosphate buffer + 0.5 cc. *M*/100 amine + 0.5 cc. tyrosinase solution.
Temp. = 25° pH = 7.38.

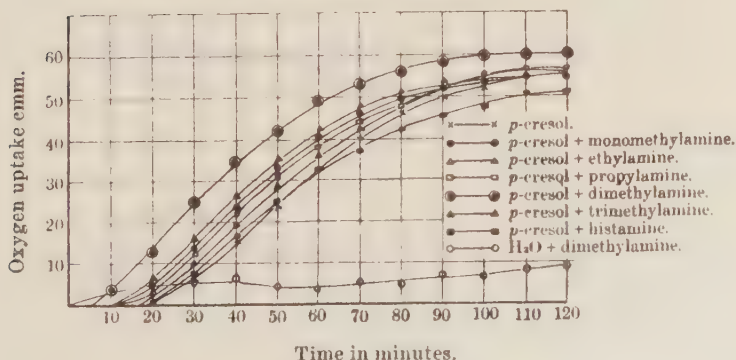
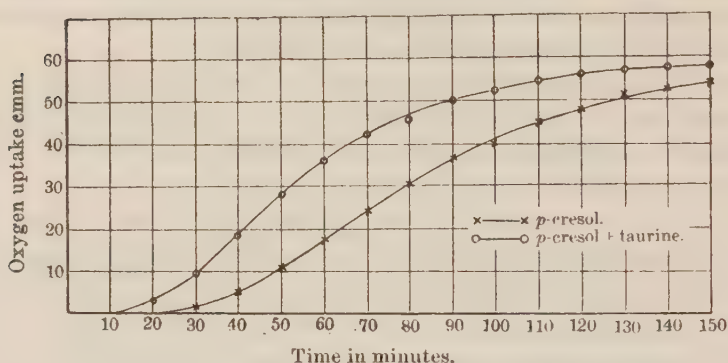


Fig. 14. Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of taurine.
0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 4.0 cc. *M*/15 phosphate buffer + 0.5 cc. *M*/100
taurine + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25° pH = 7.38.



hydrazine was then examined. The results are recorded in Fig. 15, 16 and 17.

1. It is clear that aniline, *o*-, *m*- and *p*-aminobenzoic acid, *o*-, *m*- and *p*-toluidine and sulphanilic acid are all capable of accelerating the oxygen uptake as in the case of amino acids.

2. *m*-phenyllendiamine, acetanilide, α -naphthylamine and phenylhydrazine have no notable action on the rate of oxygen

Fig. 15. Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of aromatic amines.

0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 4.0 cc. *M*/15 phosphate buffer + 0.5 cc. *M*/100
amine + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25° pH = 7.38.

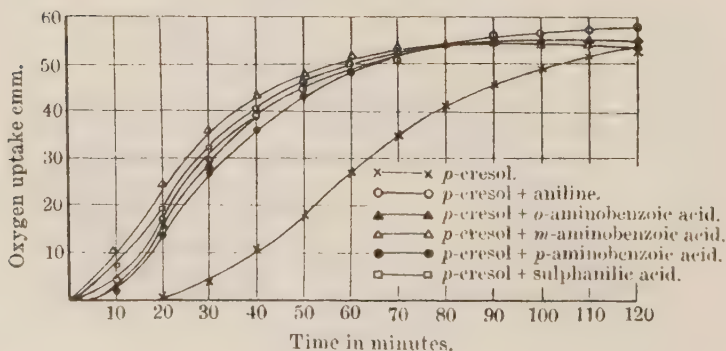


Fig. 16. Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of aromatic amines.

0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 4.0 cc. *M*/15 phosphate buffer + 0.5 cc. *M*/100 amine + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25° pH = 7.38.

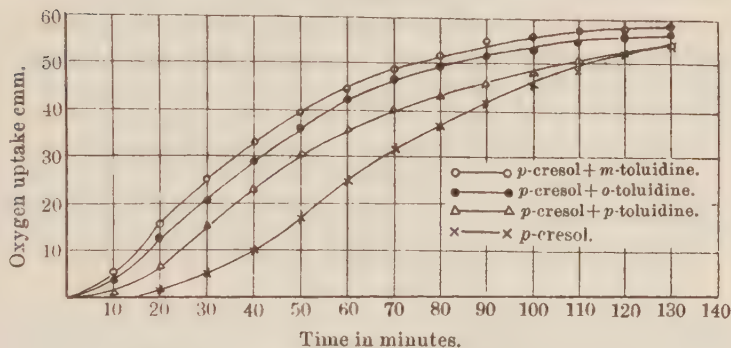
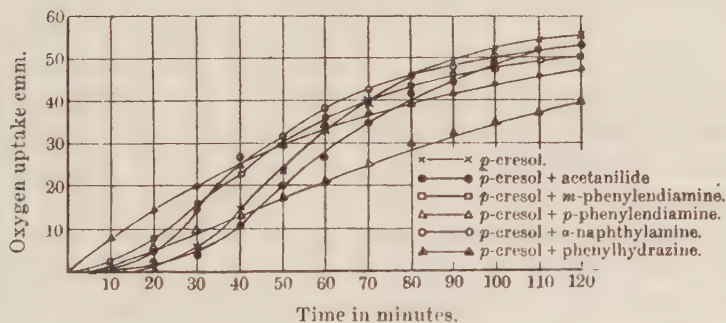


Fig. 17. Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of aromatic amines.

0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 4.0 cc. *M*/15 phosphate buffer + 0.5 cc. *M*/100 amine + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25° pH = 7.38.



consumption, while *p*-phenyldiamine rather depresses the oxygen absorption.

It was already mentioned in the introductory section that orthoquinones which are produced by the action of tyrosinase combine with aniline to form anilino compounds. From the observation that various amino acids showed exactly the same accelerating action on the oxygen consumption of the tyrosinase

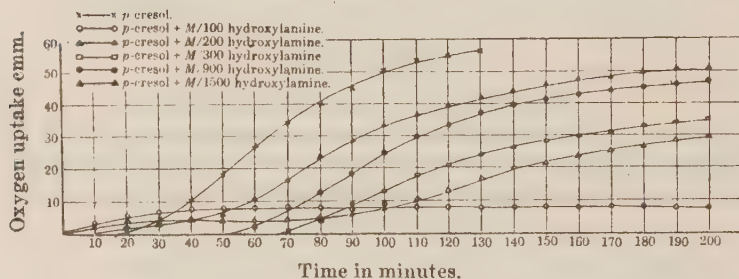
system as that of aniline and its derivatives, it is highly probable that amino acids also may combine with ortho-quinone produced by the oxydation of phenolic substances.

c) The effect of hydroxylamine was then studied and the results, as shown in Fig. 18, was obtained. Since the presence of hydroxylamine caused a remarkable result, it was added in varying amounts and the effect on the oxygen uptake was examined.

Fig. 18. Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of hydroxylamine.

0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 4.0 cc. *M*/15 phosphate buffer + 0.5 cc. *M*/100 – *M*/1500 hydroxylamine + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25° pH = 7.38.



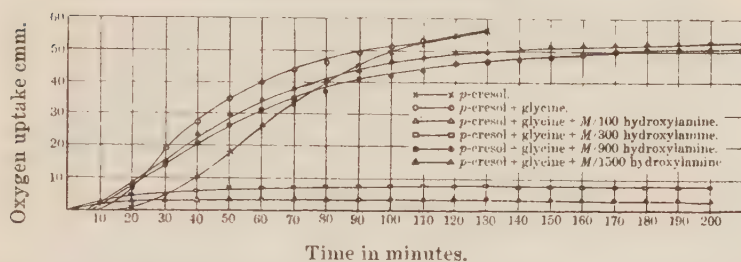
As mentioned previously the presence of hydroxylamine in the *p*-cresol-tyrosinase system accelerates the formation of coloured substances. The oxygen-uptake, however, as indicated in Fig. 18, was depressed by hydroxylamine in a very curious way. There is at first a slight oxygen uptake when hydroxylamine is present in higher concentrations and the main consumption of oxygen takes place always after a lapse of latent period, the duration of which being dependent upon the amount of hydroxylamine added. It must be also noted that when the proportion of *p*-cresol and hydroxylamine is 1:3 no further oxygen consumption was observed after an initial slight oxygen uptake.

The effect of hydroxylamine in the presence of glycine was then examined and the following result was obtained (Fig. 19).

It will be seen from Fig. 19 that in the presence of glycine the initial latent period of oxygen uptake was eliminated and that

Fig. 19. Action of tyrosinase on *p*-cresol in the presence of hydroxylamine and glycine.

0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 2.0 cc. *M*/7.5 phosphate buffer + 1.5 cc. distilled water
+ 0.5 cc. *M*/100—*M*/1500 hydroxylamine + 0.5 cc. *M*/100 glycine
+ 0.5 cc. tyrosinase solution.
Temp. = 25° pH = 7.38.



when hydroxylamine is present in a concentration more than equimolar to that of *p*-cresol, no further oxygen was taken up after an initial slight oxygen consumption, while in lower concentrations of hydroxylamine the oxygen uptake was only slightly inhibited.

d) In order to elucidate this abnormal finding in the case of hydroxylamine from another point of view the potentiometric study was made of the reaction mixtures:

p-cresol + phosphate buffer + H₂O or hydroxylamine + tyrosinase.

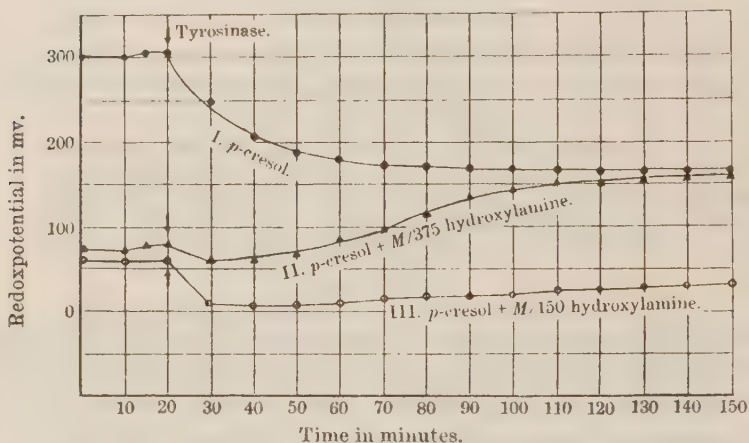
The vacuum electrode vessel of Kodama and Dixon, modified by Yasuoka and the author, was used for determining the reduction potential. Into the reaction vessel were introduced 1 cc. of *M*/30 *p*-cresol, 1 cc. of *M*/5 phosphate buffer, pH 7.38 and 1 cc. of *M*/150 or *M*/375 hydroxylamine solution or 1 cc. of distilled water and into the side compartment 1 cc. of tyrosinase solution. After the vessel was completely evacuated, it was kept in a water bath at 30°. The reduction potential was measured at intervals of ten minutes. When this attained the constant value, the tyrosinase solution was added to the main compartment and the further change in the potential was traced. The results are shown in Fig. 20.

It will be seen from Fig. 20 that hydroxylamine itself shows a high reduction potential. It is however broken down gradually in the reaction mixture and when it is added in a lower concentration

Fig. 20. Redoxpotential of tyrosinase system in the presence of hydroxylamine.

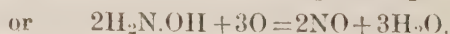
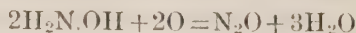
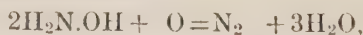
1.0 cc. *M*/30 *p*-cresol + 1.0 cc. *M*/5 phosphate buffer + 1.0 cc. distilled water or 1.0 cc. hydroxyl-amine solution + 1.0 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 30° pH = 7.38.



(curve II in the Fig.) the potential of the mixture gradually rises and approaches to that of *p*-cresol + tyrosinase. It must be further noted from Fig. 18 and 20 that the time at which this occurs, hydroxylamine being completely decomposed, coincides fairly well with that when the oxygen uptake of the system begins to take place for the first time.

It is clear from these facts that the depression of the oxygen uptake in the presence of hydroxylamine is in some way associated with the decomposition of hydroxylamine in the reaction mixture. The exact nature of this phenomena needs further elucidation. One of the probable causes may however be the fact that hydroxylamine decomposes with the production of a certain gas which is insoluble in water. Namely, the O_2 -molecule activated by tyrosinase will be readily accepted by hydroxylamine producing N_2 , N_2O or NO gas, thus without changing the pressure equilibrium in the reaction vessel to a noticeable extent.



SUMMARY.

1. In this paper the comparison was made of the action of tyrosinase on various phenolic substances alone or in the presence of a number of amino acids and other amino compounds.

2. Only those phenols, which are likely to produce ortho-quinones on oxydation gave coloured substances and the presence of amino acids markedly accelerated the production of pigments.

3. The oxygen up-take per molecule of *p*-cresol or catechol by the action of tyrosinase was found to be one atom more than that corresponding to the formation of ortho-quinone.

4. The presence of amino acids and a series of aromatic amino compounds remarkably accelerated the rate of oxygen consumption. The total amount of oxygen absorbed however was not in any way affected by the addition of amino compounds.

5. The suggestion was made that amino acids combine with orthoquinones produced by the tyrosinase action.

6. Hydroxylamine accelerated the colour development of the tyrosinase system. The oxygen consumption was on the contrary depressed. The discussion was made on the probable cause of this phenomena.

In conclusion the author wishes to express his sincere thanks to Prof. K. Kodama and Prof. M. Shiraki for their continual interest and much valuable advice during this work, to Assistant Prof. T. Uchino for his kind direction through-out this work.

REFERENCES.

- Chodat (1925): Abderhalden, Handbuch der biol. Arbeitsmethoden, Abt. 4, Teil 1, 377.
Dulier and Raper (1930): Biochem. JI., **24**, 239.
Happold and Raper (1925): Biochem. JI., **19**, 92.
Kodama, K. (1926): Bioch. JI., **20**, 1095.
Okuyama (1929): JI. of Biochem., **10**, 463.
Pugh and Raper (1927): Biochem. JI., **21**, 1370.
Raper, H. S. (1923-1927): Biochem. JI., **17**, 454; **19**, 84, 911; **20**, 69, 735; **21**, 89.
Robinson and McCance (1925): Biochem. JI., **19**, 251.

INDEX TO VOLUME 23.

A

- Alkali hydrolysis, Studies on the ——— of diketopiperazines and aniline peptides and its dissociation constants. 241.
- Alkaline buffer, Cause of the potential drift of quinhydrone electrode applied to solutions of ———, of amino acid or of protein, or to plasma. 187.
- Amino acid, Cause of the potential drift of quinhydrone electrode applied to solutions of alkaline buffer, of ——— or of protein, or to plasma. 187.
- Amino compound, The action of the potato tyrosinase on various phenolic substances and the effect of addition of various ———s on that tyrosinase system. 455.
- Amylase, On ——— and peroxidase. 125.

B

- β -glucuronosidase, On ———. 305.
- Bakteriellen Abbau, Über die d-, l-Tolylalanin und ihren ———, 139.
- BEBESCHIN, K. W. und I. A. SMORDINZEW. Beiträge zur Chemie der Heminthen Mitt. III. Die chemische Zusammensetzung des Taenia Solium. 19.
- Biochemical analysis, A modified Zuckerkandl and Messiner-Klebermass method for determination of

N-mono-acetylglucosamine and its application to ———. 371.

- Blood pH, Studies on the ——— estimated by the glass electrode method. 335.
- Blutzucker, Beiträge zur Kenntnis des sog. gebundenen ———s. 161, 171.
- Bull tissue, A few modifications of the Zuckerkandl and Messiner-Klebermass method for determination of glucosamine and distribution of glucosaminase among ———s. 365.

C

- Calciumgehalt, Das Auftreten der Rachitis bei Gallosterin als Lieferquelle des Vitamin A und normaler Proportion des Phosphor und ———s der gebrauchten Salzmixtur. 71.
- Canalin, The constitution of canavanin and ———. 181.
- Canavanin, Studies on a diamino acid, ———. 181.
- Capillary blood, A new micro-glass electrode and the pH of arterial, venous and ———. 335.
- Carbohydrate, Biochemical studies on ———s. 365.
- Cholin, Über die Bestimmung des ———s. 211.
- Citrullin, Durchblutungsversuche des Magens mit Ornithin und mit ———. 131.
- Co-enzyme, Glyoxalase and its ———. 139.

Coefficient D, La propriété "Tampon" des extraits de viande et le ——. 449.

Conductibilité électrique, La détermination de la ——— et de la tension superficielle des extraits de viande en tant que procède d'appréciation de la qualité de celle-ci. 453.

D

Diamino acid, Studies on a ——— canavanin. 181.

Diketopiperazine, Studies on the alkali hydrolysis of ———s and anilin peptides and its dissociation constants. 241.

Durchblutungsversuche des Magens. 131.

E

Eiweiss-Fettdiät, Über das Verhalten des sog. gebundenen Blutzuckers bei der ——— mit besonderer Berücksichtigung seiner Beziehung zu dem freien Blutzucker. 161.

Enzyme, Spectroscopic studies on purified ——. 125.

Enzymic hydrolysis of nucleotides and nucleosides. 351.

F

Fällungsreaktion, Über das Reagens einer ——— des Lepraserums. 377.

Fällungsreaktion, Untersuchungen über Kephalin als Reagens der ——— des Lepraserums. 437.

Fishes as the test subject for biological action of various chemical

substances and the studies on the question on the chemical nature of urease. 267.

G

Gallosterin, Das Auftreten Rachitis bei ——— als Lieferquelle des Vitamin A und normaler proportion des Phosphor- und Calciumgehalts der gebrauchten Salzmixtur. 71.

Glass electrode method, Studies on the blood pH estimated by the ———. 335.

Glass electrode potential, Studies on the nature of the ———. 91.

Glucosaminase, A few modifications of the Zuckerkandl and Messiner-Klebermass method for determination of glucosamine and distribution of ——— among bull tissues. 365.

Glucosamine, A few modifications of the Zuckerkandl and Messiner-Klebermass method for determination of ——— and distribution of glucosaminase among bull tissues. 365.

Glutathion, The mechanism of the action of ——— as the co-enzyme of glyoxalase. 319.

Glyoxalase, The mechanism of the action of glutathions as the co-enzyme of ——. 319.

Glyoxalase and its co-enzyme. 41, 319.

H

Haemoglobin, On the buffering power of ——— denatured by heat. 101.

Heminthen, Beiträge zur Chemie der ——. 19.

Hexosediphosphoric acid, The action of tumour tissue on ———. 421.

Hunger, Über das Verhalten des sog. gebundenen Blutzuckers bei ——— mit besonderer Berücksichtigung seiner Beziehung zu dem freien Blutzucker. 171.

Hydrolysis of purine ribonucleotides. 351.

I

ISHIKAWA, H. and Y. KOMITA. Enzymic hydrolysis of nucleotides and nucleosides. I. Hydrolysis of purine ribonucleotides. 351.

ITO, Ryoji. On the existence of a substance which controls the splitting and synthetic action of lipase. I. Report. 299.

ITO, Ryoji. Spectroscopic studies on purified enzymes. II. Report. On amylase and peroxidase. 125.

K

KAWAMOTO, Nobuyuki. Fiches as the test subject for biological action of various chemical substances and the studies on the question on the chemical nature of urease. 267.

Kephalin, Untersuchung über ——— als Reagens der Fällungsreaktion des Lepraserums. 437.

Kidney, On ——— glyoxalase. 41.

KITAGAWA, Matsunosuke and TAKANI, Akishige. Studies on a diamino acid, canavanin. IV. The constitution of canavanin and canalin. 181.

KITUGAWA, Ken'ichi. Durchblutungsversuche des Magens. XII. Mit-

teilung. Durchblutungsversuche des Magens mit Ornithin. und mit Citrulin. 131.

KOMITA, Y. and ISHIKAWA, H. Enzymic hydrolysis of nucleotides and nucleosides. I. Hydrolysis of purine ribonucleotides. 351.

KRYLOVA, N. N. et SMORODINTSEV, I. A. La détermination de la conductibilité électrique et de la tension superficielle des extraits de viande en tant que procede d'appréciation de la qualité de celle-ci. 435.

L

Leberasparaginase, Über die ———. 57.

Leptra, Forschung über die Serumreaktion der ———. 377, 437.

Lepraserums, Über das Reagens einer Fällungsreaktion des ———s. 377.

Lepraserum, Untersuchungen über Kephalin als Reagens der Fällungsreaktion des ———s. 437.

Lipase, On the existence of a substance which controls the splitting and synthetic action of ———. 299.

M

Magen, Durchblutungsversuche des ———s. 131.

MATSUOKA, Yoshimasa. Beiträge zur Kenntnis des sog. gebundenen Blutzuckers. I. Mitteilung. Über das Verhalten des sog. gebundenen Blutzuckers bei der Eiweiss-Fettdiät mit besonderer Berücksichtigung seiner Beziehung zu dem freien Blutzucker. 161.

II. Mitteilung. Über das Verhalten des sog. gebundenen Blutzuckers bei Hunger mit beson-

derer Berücksichtigung seiner Beziehung zu dem freien Blutzucker. 171.

Messiner-Klebermass method, A few modifications of the Zuckerkandl and ——— for determination of glucosamine and distribution of glucosaminase among bull tissues. 365, 371.

Micro-glass electrode, A new ——— and the pH of arterial, venous and capillary blood. 335.

MURAO, Shizuo. Experimentelle Untersuchungen über das Auftreten der Rachitis. Das Auftreten der Rachitis bei Gallosterin als Lieferquelle des Vitamin A und normaler Proportion des Phosphor- und Calciumgehalts der gebrauchten Salzmixtur. 71.

N

N-mono-acetylglucosamine, A modified Zuckerkandl and Messiner-Klebermass method for determination of ——— and its application to biochemical analysis. 371.

NAGAOKA, Hiroshi. On the buffering power of haemoglobin denatured by heat. 101.

NAGAYA, K. YAMAZOYE, S. and S. NAKAMURA. Glyoxalase and its Co-enzyme. II. On kidney glyoxalase. 41.

NAKAMURA, S., NAGAYA, K., YAMAZOYE, S. Glyoxalase and its Co-enzyme. II. On kidney glyoxalase. 41.

NIKOLAJEWA, N. W. und I. A. SMORODINZEW. Zur Frage über den Chemismus des Regoris Mortis. 27.

NOBUTANI, Fujio. Studies on tyrosinase. II. The action of the

potato tyrosinase on various phenolic substances and the effect of addition of various amino compounds on that tyrosinase system. 455.

Nucleoside, Enzymic hydrolysis of nucleotides and ———s. 351.

Nucleotide, Enzymic hydrolysis of ———s and nucleosides. 351.

O

ODA, Matazo. Studies on the alkali hydrolysis of diketopiperazines and aniline peptides and its dissociation constants. 241.

Ornithin, Durchblutungsversuche des Magens mit ——— und mit citrulin. 131.

OSHIMA, Genpachi. On β -glucuronosidase. III. Report. 305.

OTSUKA, Ichiro und SASAKI, Takaoki. Über die d-, l-Tylosalanin und ihren bakteriellen Abbau. 139.

P

Peroxidase, On amylase and ———. 125.

Peroxidase, Studies on ———. 1.

pH A new micro-glass electrode and the ——— of arterial, venous and capillary blood. 335.

Phenolic substance, The action of the potato tyrosinase on various ———s and the effect of addition of various amino compounds on that tyrosinase system. 455.

Phosphor, Das Auftreten der Rachitis bei Gallosterin als Lieferquelle des Vitamin A und normaler Proportion des ———, und Calciumgehalts der gebrauchten Salzmixtur. 71.

Plasma, Cause of the potential drift

of quinhydrone electrode applied to solutions of alkaline buffer, of amino acid or of protein, or to ——. 187.

Potato tyrosinase, The action of the ——— on various amino compounds on that tyrosinase system. 455.

Protein, Cause of the potential drift of quinhydrone electrode applied to solutions of alkaline buffer, of amino acid or of ———, or to plasma. 187.

Purine ribonucleotide, Hydrolysis of ———s. 351.

Q

Quinhydrone electrode, Cause of the potential drift of ——— applied to solutions of alkaline buffer, of amino acid or of protein, or to plasma. 187.

R

Rachitis, Experimentelle Untersuchungen über das Auftreten der ——. 71.

Rigoris Mortis, Zur Frage über den Chemismus des ———. 27.

S

SAKAKIBARA, Ihoe. Forschung über die Serumreaktion der Lepra. Über das Peagens einer Fällungsreaktion des Lepraserums. 377.

SAKAKIBARA, Ihoe. Forschung über die Serumreaktion der Lepra. Untersuchungen über Kephalin als Reagens der Fällungsreaktion des Lepraserums. 437.

SAKAKIBARA, Ihoe und YOSHINAGA,

Tosio. Über die Bestimmung des Cholins. 211.

Salzmixtur, Das Auftreten der Rachitis bei Gallosterin als Lieferquelle des Vitamin A und normaler Proportion des Phosphor- und Calciumgehalts der gebrauchten ——. 71.

SASAKI, Takaoki und OTSUKA, Ichiro. Über die d, l-Tyrosin und ihren bakteriellen Abbau. 139.

Serumreaktion, Forschung über die ——— der Lepra. 377, 437.

SMORODINZEV, I. A. et N. N. KRYLOVA. La détermination de la conductibilité électrique et de la tension superficielle des extraits de viande en tant que procédé d'appréciation de la qualité de celle-ci. 453.

SMORODINTSEV, I. A. et P. A. TSYGANOVA. La propriété "Tampon" des extraits de viande et le coefficient D. 449.

SMORODINZEV, I. A. und K. W. BESCHIN. Beiträge zur Chemie der Heminthen Mitt. III. Die chemische Zusammensetzung des Taenia Solium. 19.

SMORODINZEV, I. A. und N. W. NIKOLAJEWA. Zur Frage über den Chemismus des Rigoris Mortis. 27.

Spectroscopic studies on purified enzymes. 125.

SUMIDA, Seiichi. Beiträge zur Kenntnis der Biochemie des Wurmfortsatzes. 147.

SUZUKI, Yoshinosuke. Über die Leber-asparaginase. 57.

T

Taenia Solium, Die chemische Zusammensetzung des ———. 19.

TAKANI, Akishige and KITAGAWA,

- Matsunosuke. Studies on a di-amino acid, canavanin. IV. The constitution of canavanin and canalin. 181.
- TAMAI, Masamitsu. Studies on peroxidase. 1.
- Tampon, La propriété — des extraits de viande et le coefficient D. 449.
- Tension superficielle, La détermination de la conductibilité électrique et de la — — des extraits de viande en tant que procédé d'appréciation de la qualité de celle-ci. 453.
- TSUZUKI, Kazuo. The action of tumour tissue on hexosediphosphoric acid. 421.
- TSYGANOVA, P. A. et SMORODINTSEV, I. A. La propriété "Tampon" des extraits de viande et le coefficient D. 449.
- Tumour tissue, The action of — — on hexosediphosphoric acid. 421.
- Tyrosinase, Studies on —. 455.
- Tyrosinase system, The action of the potato tyrosinase on various phenolic substances and the effect of addition of various amino compounds on that — —. 455.
- U**
- Urease, Fishes as the test subject for biological action of various chemical substances and the studies on the question on the chemical nature of —. 267.
- V**
- Venous, A new micro-glass electrode and the pH of arterial, — and capillary blood. 335.
- Viande, La propriété "Tampon" des extraits de — et le coefficient D. 449.
- Vitamin A, Das Auftreten der Rachitis bei Gallosterin als Lieferquelle des — und normaler Proportion des Phosphor- und Calciumgehalts der gebrauchten Salzmixtur. 71.
- W**
- WATANABE, Kuniichi. Biochemical studies on carbohydrates. XIV. A few modifications of the Zuckerkandl on a Messiner-Klebermass method for determination of glucosamine and distribution of glucosaminase among bull tissues. 365.
- XV. A modified Zuckerkandl and Messiner-Klebermass method for determination of N-monoacetylglucosamine and its application to biochemical analysis. 371.
- Wurmfortsätze, Beiträge zur Kenntnis der Biochemie des —s. 147.
- Y**
- YAMAZOE, Samuro. Glyoxalase and its Co-enzyme. III. The mechanism of the action of glutathione as the Co-enzyme of glyoxalase. 319.
- YAMAZOE, S. NAGAYA, K. and NAKAMURA, S. Glyoxalase and its Co-enzyme. II. On kidney glyoxalase. 41.
- YOSHIMURA, Hisato. A new micro-glass electrode and the pH of arterial, venous and capillary blood. (Studies on the blood pH estimated by the glass electrode method. V.) 335.

- YOSHIMURA, Hisato. Cause of the potential drift of quinhydrone electrode applied to solutions of alkaline buffer, of amino acid or of protein, or to plasma. 187.
- YOSHIMURA, Hisato. Studies on the nature of the glass electrode potential. I. 91.
- YOSHINAGA, Tosio und SAKAKIBARA, Ihoe. Über die Bestimmung des

Cholins. 211.

Z

- Zuckerkandl, A few modifications of the — and Messiner-Klebermass method for determination of glucosamine and distribution of glucosaminase among bull tissues. 365, 371.

檢 印



Contents

No. 3, May, 1936.

YOSHIMURA, Hisato. A new micro-glass electrode and the pH of arterial, venous and capillary blood. (Studies on the blood pH estimated by the glass electrode method. V)	335
ISHIKAWA, H. and Y. KOMITA. Enzymic hydrolysis of nucleotides and nucleosides. I. Hydrolysis of purine ribonucleotides	351
WATANABE, Kuniichi. Biochemical studies on carbohydrates. XIV. A few modifications of the Zuckerkandl and Messiner-Klebermass method for determination of glucosamine and distribution of glycosaminase among bull tissues	365
XV. A modified Zuckerkandl and Messiner-Klebermass method for determination of N-mono-acetylglucosamine and its application to biochemical analysis	371
SAKAKIBARA, Ihoe. Forschung über die Serumreaktion der Lepra. Über das Reagens einer Fällungsreaktion des Lepraserums	377
TSUZUKI, Kazuo. The action of tumour tissue on hexosediphosphoric acid	421
SAKAKIBARA, Ihoe. Forschung über die Serumreaktion der Lepra. Untersuchungen über Kephalin als Reagens der Fällungsreaktion des Lepraserums	437
SMORODINTSEV, I. A. et P. A. TSYGANOVA. La propriété "Tampon" des extraits de viande et le coefficient D	449
SMORODINTSEV, I. A. et N. N. KRYLOVA. La détermination de la conductibilité électrique et de la tension superficielle des extraits de viande en tant que procédé d'appréciation de la qualité de celle-ci	453
NOBUTANI, Fujio. Studies on tyrosinase. II. The action of the potato tyrosinase on various phenolic substances and the effect of addition of various amino compounds on that tyrosinase system	455